



UNIVERSIDADE  
DO BRASIL  
UFRJ

INSTITUTO DE BIOLOGIA – CEDERJ



ESTUDO DA COMPOSIÇÃO DE LIPÍDIOS NEUTROS EM MACRÓFAGOS  
PERITONEAIS DE CAMUNDONGOS BALB/C DURANTE A INFECÇÃO COM  
*LEISHMANIA (L.) AMAZONENSIS*

KAROLINE DOS ANJOS LIMA

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO  
PÓLO UNIVERSITÁRIO DE DUQUE DE CAXIAS

2018



UNIVERSIDADE  
DO BRASIL  
UFRJ

INSTITUTO DE BIOLOGIA – CEDERJ



ESTUDO DA COMPOSIÇÃO DE LIPÍDIOS NEUTROS EM MACRÓFAGOS  
PERITONEAIS DE CAMUNDONGOS BALB/C DURANTE A INFECÇÃO COM  
*LEISHMANIA (L.) AMAZONENSIS*

KAROLINE DOS ANJOS LIMA

Monografia apresentada como atividade obrigatória à integralização de créditos para conclusão do Curso de Licenciatura em Ciências Biológicas – Modalidade semipresencial.

Orientadora: Georgia Correa Atella.

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO  
PÓLO UNIVERSITÁRIO DE DUQUE DE CAXIAS

2018

#### **FICHA CATALOGRÁFICA**

LIMA, Karoline dos Anjos.

Estudo da composição de lipídios neutros em macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c durante a infecção com *Leishmania (L.) amazonensis*. Polo Universitário de Duque de Caxias, Ano 2018. 53 f. il: 31 cm

Orientadora: Georgia Correa Atella.

Monografia apresentada à Universidade Federal do Rio de Janeiro para obtenção do grau de Licenciada no Curso de Licenciatura em Ciências Biológicas – Modalidade semi-presencial. Ano 2018.

Referências bibliográficas: f.48-52

1. Palavras Chaves: Ácidos graxos; interação parasita hospedeiro; leishmaniose cutânea; macrófagos murinos; metabolismo lipídico.

I. ATELLA, Georgia Correa. (Orient.)

II. Universidade Federal do Rio de Janeiro. Licenciatura em Ciências Biológicas – Modalidade semipresencial.

III. Estudo da composição de lipídios em macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c durante a infecção com *Leishmania (L.) amazonensis*.



UNIVERSIDADE  
DO BRASIL

UFRJ



instituto de biologia  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO

**ATA - DEFESA DE MONOGRAFIA DE PROJETO FINAL**

**NOME DO GRADUANDO (A)**

Karoline dos Anjos Lima

**MATRÍCULA**

13214020172

**LICENCIATURA EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS – IB – UFRJ – EAD – POLO DUQUE DE CAXIAS**

**TÍTULO DA MONOGRAFIA**

**Estudo da composição de lipídios em macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c durante a interação com Leishmania (L.) amazonensis.**

**NOME DOS MEMBROS DA BANCA**

Orientador

Georgia Corrêa Atella

**TÍTULO**

Doutora

**ASSINATURA**

*Georgia Corrêa Atella*

Michele Souza Lima

Doutora

*Michele Souza Lima*

Alessandra Catarina Chagas Lima

Mestre

*Alessandra Catarina Chagas Lima*

Data: 06/12/2018

☒ **APROVADO (A)**

☐ **REPROVADO (A)**

**HAVENDO SUGESTÕES NA DEFESA, COLOCAR TÍTULO MODIFICADO DA MONOGRAFIA**

*Estudo da composição de lipídios murinos em macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c durante a infecção com Leishmania (L.) amazonensis.*

**Sr.(a) Coordenador (a):** encaminho, em anexo, a versão revisada do Trabalho Final de Curso nos formatos impresso e digital. Atesto que tal versão contempla as sugestões e/ou observações feitas pela banca durante a defesa.

**ASSINATURA DO ORIENTADOR**

*Georgia Corrêa Atella*

**LOCAL E DATA**

*Rio, 06/12/2018*

**ASSINATURA DO COORDENADOR DO CURSO**

**LOCAL E DATA**

Dedico aos meus avós Francisco (*in memoriam*) e Anália,  
aos meus pais e aos meus queridos irmãos,  
meus amores.

Este projeto foi executado no Laboratório de Bioquímica de Lipídios e Lipoproteínas, do Instituto de Bioquímica Médica Leopoldo de Meis, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Rio de Janeiro - UFRJ, sob a orientação da Prof<sup>a</sup>. Georgia Correa Atella, em constância dos auxílios financeiros outorgados pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ), Institutos Nacionais de Ciência e Tecnologia (INCT), e devido a Programas de Iniciação Científica e Tecnológica (PIBIC e PIBITI) uma parceria da UFRJ ao CNPq.

## AGRADECIMENTOS

Nunca imaginei que esta sessão da monografia que seria tão difícil de escrever. Ser grata no dia a dia é muito mais simples. Então se faltarem pessoinhas, saibam que suas atitudes me proporcionaram chegar aqui, muito obrigada.

Agradeço a todos os professores e tutores por me proporcionarem o conhecimento não apenas racional, mas a manifestação do caráter e afetividade da educação no processo de formação profissional, pelo tanto que se dedicaram a mim, não somente por terem me ensinado, mas por terem me feito aprender.

A Universidade Federal do Rio de Janeiro e ao Consórcio CEDERJ, pela oportunidade de fazer o curso.

A minha orientadora Georgia C. Atella, por ter me recebido de braços abertos, vislumbrado o potencial que eu poderia alcançar mesmo no início da iniciação científica, por me ensinar a ‘ser bela radioativa e do lab’ e ajudar a crescer, ser mais confiante.

Aos meus breves coorientadores, oficiais ou não, cada um de vocês surgiu num momento em que eu precisei aprender algo novo e eu sou grata por terem me ensinado. Como a Michele que me recebeu no laboratório, me orientou sobre as boas práticas no laboratório e os primeiros experimentos. Como dei trabalho! E além disso se mostrou muito amiga e um exemplo de que é possível concluir a graduação aos moldes que fizemos, obrigada! A Alessandra, grande amiga para inúmeros momentos, por ter me ensinado as práticas de cultivo celular, a não contaminar minhas células, e por não ter me passado ‘o fator Alessandra’, obrigada! A Karina Martins por me ensinar a trabalhar com células aderidas, obrigada! E finalmente ao George, que me coorientou por anos e junto a Georgia deu rumo aos meus tantos projetos, focando no que agora compõe a minha monografia, por ter sido amigo, por me acompanhar várias vezes no caminho pra casa, por fazer piada de tudo, por aguçar meus sentidos em perceber ironias, pela ajuda e pelo suporte, um imenso obrigada! No geral eu entendo que foi difícil me orientar, algumas vezes pela minha irreverência, outras pela minha ignorância e principalmente por eu naturalmente ser autossuficiente. Agradeço por cada ‘puxão de orelha’, foi muito importante para a minha formação.

Agradeço à MSc Alessandra Catarina Chagas Lima e à Dr<sup>a</sup> Michele Souza Lima por aceitarem o convite para fazerem parte da banca examinadora deste trabalho.

A Prof<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Lúcia Helena P. da Silva e sua mestrandia Raissa Couto Santana, do Laboratório de Imunologia Veterinária (LIV) do Instituto de Veterinária da Universidade

Federal Rural do Rio de Janeiro (IV-UFRRJ) por todos os experimentos em conjunto. Por tornar possível o meu modelo experimental, muito obrigada!

À querida técnica Mileane Busch, pela ajuda com a caracterização de ácidos graxos no GC/MS, pelas dicas durante a execução dos experimentos, pelas miniaulas de química, por muitas outras ajudas no cotidiano do laboratório e principalmente por ser sempre amiga e atenciosa.

Aos companheiros que fizeram parte do Laboratório de Bioquímica de Lipídios e Lipoproteínas (LBLL) durante a composição deste projeto como: Alessa, Cinara, Daiene, Géssica, Glauber, Isabella, Izabelle, Jéssica Oliveira, Livia, Maria Fernanda, Miria, Naycon, Nathália, Nuccia, Pedro, Rayanne, Soraia, Suellen, Tainá, Yuri. E outros membros que passaram a compor o nosso grande grupo (LBLL) como: Ana, Carlos, Carlúcio, Catharina, Fillipe, Guilherme, Júlia, Monique, Rodrigo, Stephanie, Willy, e um agradecimento especial ao Prof. Mário Alberto (*in memoriam*) que os orientou por anos, além disso, me deu várias dicas sobre este trabalho e sempre deixou seu laboratório aberto para que eu pudesse ingressar na linha de pesquisa em modelo murino. Aos componentes do Laboratório de Fisiologia e Bioquímica de Insetos, Bruno, Daniela, Gleidson, Iron (grande amigo, conselheiro sobre radioatividade e carreira em biociências), Samara e Valdir, sob a orientação da querida Prof<sup>a</sup> Kátia Calp. Aos membros do Laboratório de Bioquímica de Insetos, Ariene, Jéssica Cristina, Larissa, Luciana, Paula, e Priscila, sob orientação do Prof. Hatisaburo Masuda e da Prof<sup>a</sup> Isabela Ramos. Um agradecimento também ao suporte dos técnicos Desenir, Gustavo, Heloísa, José Junior, Jorge, Lauriene, Lílian e Yasmin (um presente, com quem eu posso contar sempre). Juntos formamos o grupo do *Sincício Prof Masuda*. Todos foram importantes por partilharmos conhecimento, momentos de descontração e os esporros.

A minha mãe superpoderosa Leonete e ao papito Alexandre, que sempre me apoiaram em quaisquer decisões que tomei para a minha acadêmica. Que abdicaram de curtir sua juventude para assumir a responsabilidade de amar, cuidar, e sustentar minhas irmãs e eu. Me ensinaram valores da vida, humildade e perseverança. Amo vocês!

Ao meu avô Francisco (*in memoriam*) que foi meu pai por muitas vezes, que me apoiou em tudo, verdadeiramente, sem pés no chão, que esteve comigo, que sonhou junto na época em que eu me preparava para ingressar na faculdade. A minha avó Anália, minha ‘mãe com açúcar’, que felizmente está aqui comigo, que é minha amiga, que cuida da minha vida melhor do que eu. Vocês, meus avós paternos, sempre se mostraram solícitos enquanto meus pais precisavam trabalhar e estudar. Eu sou muito grata por tudo, amo vocês.



Às minhas irmãs Gabriele e Karine, minhas amigas, brigamos por tudo, porém sempre nos resolvemos, ao meu irmão Vinícius que é o mais tranquilo e é vítima da ira das mulheres da casa. Cada um de vocês tem a sua peculiaridade e eu como irmã mais velha sou mandona, dou esporro, mas é com muito amor e carinho (por dentro), para o bem de vocês, pessoas que amo. À minha prima Janaína, é minha irmã mais velha (de coração) e age como tal, participou desta jornada comigo, sua sinceridade e seus pontos de vista diferentes dos meus, que certamente me fazem refletir e analisar que caminhos irei seguir. Obrigada, amo vocês!

A minha Tia Naná, é outra mãe com açúcar, que sempre me incentivou a estudar para alcançar um futuro digno. Te amo tanto tia, obrigada!

Aos amigos adquiridos na graduação André, Carlos, Everson, Luciene, Wallace – além de Cinara e Yasmin já citadas – vocês foram parceiros em muitos momentos, desde as ajudas para compreender as disciplinas, confecção de ADs, perrengue nos dias de aulas práticas e de APs. Nem sempre nos víamos com frequência, e praticamente, nunca todos nós juntos, mas sempre arrumamos um jeito de colocar os assuntos em dia, mesmo que fosse via internet ou até em *happy hour* após um dia de prova/trabalho. Obrigada estarem presentes, por me incentivarem a prosseguir.

A todos que direta ou indiretamente fizeram parte da minha formação, o meu muito obrigada!

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>15</b>
1.1. As leishmanioses .....	15
1.1.1. Biologia .....	15
1.1.2. Epidemiologia .....	18
1.2. Modelos murinos e sua importância para o estudo das leishmanioses .....	20
1.3. Metabolismo de lipídios .....	21
1.3.1. Estrutura e função dos lipídios .....	21
1.3.2. Metabolismo lipídico em macrófagos murinos e <i>Leishmania</i> .....	22
<b>2. JUSTIFICATIVA .....</b>	<b>25</b>
<b>3. OBJETIVOS .....</b>	<b>26</b>
3.1. Objetivo Geral .....	26
3.2. Objetivos Específicos .....	26
<b>4. MATERIAL &amp; MÉTODOS .....</b>	<b>27</b>
4.1. Cultivo e manutenção do modelo experimental .....	27
4.1.1. Animais .....	27
4.1.2. Obtenção de Macrófagos Murinos .....	27
4.2. Protocolo experimental – Interação parasitária em macrófagos murinos .....	28
4.3. Desenho experimental - Incubação com precursor lipídico ácido graxo- <sup>3</sup> H .....	29
4.4. Análise de lipídios .....	30
4.4.1. Extração de lipídios .....	30
4.4.2. Lipídios totais marcados com ácido graxo- <sup>3</sup> H .....	30
4.4.3. Cromatografia em camada fina (TLC) .....	31
4.4.4. Cromatografia gasosa com Espectrometria de Massa (GC/MS) .....	32
4.5. Análise estatística .....	34
<b>5. RESULTADOS .....</b>	<b>35</b>
5.1. A incorporação de ácido palmítico- <sup>3</sup> H .....	35
5.2. A captação e biossíntese do ácido palmítico- <sup>3</sup> H em lipídios neutros mais complexos .....	36
5.3. Caracterização de ácidos graxos de cadeia longa .....	38
<b>6. DISCUSSÃO .....</b>	<b>41</b>
<b>7. CONCLUSÃO .....</b>	<b>47</b>
<b>8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>48</b>

## RESUMO

A leishmaniose é uma doença tropical negligenciada, causada por protozoários do gênero *Leishmania*. Parte do ciclo de vida de *Leishmania (L.) amazonensis* envolve sua interação com o hospedeiro vertebrado, que é iniciada pela picada de dípteros flebotomíneos infectados. Nele, formas promastigotas do parasita são fagocitadas por macrófagos. Nesse momento, para sua sobrevivência, o protozoário manipula os mecanismos moleculares de resposta imune, mediada pelos macrófagos, passando assim à fase amastigota intracelular, onde inicia a proliferação, rompimento da célula e infecção de outros macrófagos. Os parasitas da família Trypanosomatidae não possuem vias completas de biossíntese e degradação de lipídios, precisando assim adquirir essas moléculas dos hospedeiros. Este trabalho tem como objetivo caracterizar as alterações no metabolismo lipídico de macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c induzidas pela infecção por *Leishmania (L.) amazonensis*. Para determinar tais alterações, foi feito o ensaio de incorporação de ácido graxo radioativo (ácido palmítico-<sup>3</sup>H) comparando células controle (não-infectadas) com células infectadas. Após a interação de *Leishmania (L.) amazonensis* com macrófagos, as células foram incubadas até 48 horas em ácido palmítico-<sup>3</sup>H complexados à albumina sérica bovina. Subsequentemente, os macrófagos foram submetidos à extração de lipídios e as diferentes classes lipídicas separadas por cromatografia de camada fina (TLC) e cromatografia gasosa (GC/MS). A radioatividade associada (a TLC) foi determinada por contagem de cintilação líquida. Os resultados indicaram absorção significativa do ácido palmítico-<sup>3</sup>H nos lipídios totais de macrófagos infectados em comparação ao grupo controle. Classes lipídicas como ácido graxo livre, triacilglicerol, e colesterol esterificado obtiveram as alterações mais significativas ( $p < 0,05$ ) utilizando o teste t de Student não pareado. Corroborando, a análise de lipídios por GC/MS em macrófagos infectados mostrou maior quantidade e diversidade de ácidos graxos, dentre eles se destacam o ácido esteárico (C18:0), o ácido araquidônico (C20:4n6), o ácido 4,7,10,13,16,19-docosahexaenóico (C22:6n3), o ácido palmítico (C16:0), o ácido oleico (C18:1n9c) e o ácido linoleico (C18:2n6c). Portanto, *Leishmania (L.) amazonensis* é capaz de manipular o metabolismo lipídico dos macrófagos murinos em benefício próprio, certamente incorporando esses lipídios para sua sobrevivência, diferenciação e proliferação do hospedeiro.

Palavras-chave: ácidos graxos; interação parasita hospedeiro; leishmaniose cutânea; macrófagos murinos; metabolismo lipídico.

## ABSTRACT

Leishmaniasis is a neglected tropical disease caused by protozoa of the genus *Leishmania*. Part of the life cycle of *Leishmania (L.) amazonensis* involves itself interaction with the vertebrate host, which is initiated by the bite of infected phlebotomine dipterans. In the vertebrate host, extracellular promastigote forms of the parasite are phagocytosed by macrophages. In this moment, for itself survival, the protozoan manipulates the molecular mechanisms of the immune response of the macrophages, passing to the intracellular amastigote phase, where it initiates proliferation, cell disruption and infection of other macrophages. It has been described that parasites of the Trypanosomatidae family don't have complete pathways of biosynthesis and lipid degradation, thus it need to acquire such molecules from its hosts, even though the literature isn't as comprehensive on the subject. This work aims to characterize the changes in the lipid metabolism of peritoneal macrophages of BALB/c mice induced by *Leishmania (L.) amazonensis* infection. To determine such changes, a labelling radioactive fatty acid ( $^3\text{H}$ -palmitic acid) assay was performed comparing control (uninfected) cells with infected cells. After the infection of *Leishmania (L.) amazonensis* with macrophages, cells were incubated for up to 48 hours in  $^3\text{H}$ -palmitic acid complexed with bovine serum albumin. Subsequently, macrophages were subjected to lipid extraction and the different lipid classes separated by thin layer chromatography (TLC) and gas chromatography (GC/MS). The associated radioactivity was determined by liquid scintillation counting. The results indicated a higher uptake of  $^3\text{H}$  -palmitic acid in the total lipids of infected macrophages compared to the control group. Lipid classes like free fatty acid, triacylglycerol, and esterified cholesterol were the most significant changes using the unpaired t-Student test,  $p < 0,05$ . In infected macrophages showed a greater quantity and diversity of fatty acids, among them stearic acid (C18: 0), arachidonic acid (C20: 4n6), acid 4,7, 10,13,16,19-docosahexaenoic acid (C22: 6n3), palmitic acid (C16: 0), oleic acid (C18: 1n9c) and linoleic acid (C18: 2n6c). Ergo, *Leishmania (L.) amazonensis* is able to manipulate the lipid metabolism of murine macrophages to their own benefit, certainly incorporating these lipids for their survival, differentiation and proliferation in the host.

Key words: cutaneous leishmaniasis; fatty acids; lipid metabolism; murine macrophages; host-parasite interaction.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

<b>Figura 1</b>	Representação dos principais estágios do desenvolvimento de <i>Leishmania (L.) amazonensis</i> .	<b>15</b>
<b>Figura 2</b>	Ciclo de vida da <i>Leishmania (L.) amazonensis</i> .	<b>17</b>
<b>Figura 3</b>	Situação epidemiológica da leishmaniose cutânea e mucocutânea, 2015.	<b>20</b>
<b>Figura 4</b>	Foto representativa de um camundongo ( <i>Mus musculus</i> ) sadio da linhagem de BALB/c.	<b>21</b>
<b>Figura 5</b>	Representação esquemática de um ácido graxo, um triacilglicerol e um colesterol esterificado.	<b>22</b>
<b>Figura 6</b>	Esquema da interação parasitária <i>in vitro</i> entre macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c e <i>Leishmania (L.) amazonensis</i> .	<b>28</b>
<b>Figura 7</b>	Esquema da incubação com precursor lipídico ácido palmítico- <sup>3</sup> H ( <sup>3</sup> H-FA) complexado a albumina livre de ácidos graxos (BSA-FFA), complexo <sup>3</sup> H-FA-BSA.	<b>29</b>
<b>Figura 8</b>	Otimização dos lipídios de amostras marcadas com <sup>3</sup> H-FA-BSA e análises realizadas	<b>31</b>
<b>Figura 9</b>	Lipídios totais marcados com ácido palmítico- <sup>3</sup> H em macrófagos murinos infectados com <i>Leishmania (L.) amazonensis</i> .	<b>35</b>
<b>Figura 10</b>	Classes lipídicas marcadas com ácido palmítico- <sup>3</sup> H em macrófagos murinos infectados com <i>Leishmania (L.) amazonensis</i> .	<b>37</b>
<b>Figura 11</b>	Cromatogramas referentes à caracterização de ácidos graxos em macrófagos murinos infectados por <i>Leishmania (L.) amazonensis</i> e controles (não infectados).	<b>39</b>
<b>Figura 12</b>	Caracterização de ácidos graxos em macrófagos murinos infectados por <i>Leishmania (L.) amazonensis</i> e controles (não infectados).	<b>40</b>
<b>Figura 13</b>	Esquema de alongamento e dessaturação de ácidos graxos de cadeia longa.	<b>44</b>
<b>Figura 14</b>	Representação esquemática do mecanismo captação de ácido palmítico- <sup>3</sup> H, seu estoque, seguido da síntese de outros lipídios, distribuição de ácidos graxos e secreção para o sobrenadante, em macrófagos murinos infectados por <i>Leishmania (L.) amazonensis</i> .	<b>46</b>

## LISTA DE TABELAS

- |                 |  |           |
|-----------------|--|-----------|
| <b>Tabela 1</b> | Distribuição das principais espécies de <i>Leishmania</i> em correlação ao tipo de doença.   | <b>19</b> |
| <b>Tabela 2</b> | Padrões comerciais para lipídios que sofreram a inserção de um éster de metila (nome sistemático). A identificação foi feita através de comparação com os controles endógenos para ácidos graxos de cadeia longa, os respectivos tempos de retenção em minutos <i>versus</i> intensidade, cujos espectros ficam armazenados no banco de dados digital do aparelho. | <b>33</b> |

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

$^3\text{H}$	Trítio ( <i>Tritium</i> )
$^3\text{H-FA}$	Ácido graxo (ácido palmítico/palmitato) conjugado a $^3\text{H}$
$^3\text{H-FA-BSA}$	BSA com $^3\text{H}$ -Palmitato incorporado
ACAT	Acil-CoA: colesterol aciltransferase
BSA	Albumina sérica bovina ( <i>Bovin Serum Albumin</i> )
BSA-FFA	Albumina sérica bovina livre de ácidos graxos ( <i>Bovin Serum Albumin - Free Fatty Acids</i> )
C12:0	Ácido láurico
C16:0	Ácido palmítico
C18:0	Ácido esteárico
C18:1n9c	Ácido oleico
C18:1n9t	Ácido elaídico
C18:2n6c	Ácido linoleico
C19:0	Ácido nonadecanóico, padrão interno para ácidos graxos de cadeia longa
C20:3n6	Ácido 8,11,14-eicosatrienóico
C20:4n6	Ácido araquidônico
C22:1n9	Ácido erúico
C22:6n3	Ácido 4,7,10,13,16,19-docosaheptaenóico
CHO	Colesterol livre ( <i>Cholesterol</i> )
CHOE	Colesterol esterificado ( <i>Cholesteryl Ester</i> )
CPM	Contagens por minuto ( <i>Counts per minute</i> )
DAG	Diacilglicerol ( <i>Diacylglycerol</i> )
DGAT	Acil-CoA: diacilglicerol aciltransferase

DPM	Desintegração por minuto ( <i>Disintegration per minute</i> )
FA	Ácidos graxo ( <i>Fatty Acids</i> )
fPPG	Proteofosfoglicano filamentoso ( <i>filamentous proteophosphoglycan</i> )
GC/MS	Cromatografia Gasosa com Espectrometria de Massa ( <i>Gas Chromatography with Mass Spectrometry</i> )
HIV	Vírus da imunodeficiência humana ( <i>Human Immunodeficiency Virus</i> )
LDL	Lipoproteína de baixa densidade ( <i>Low density lipoprotein</i> )
MAG	Monoacilglicerol ( <i>Monoacylglycerol</i> )
PPAR $\gamma$	Receptor $\gamma$ ativado por proliferador de peroxissomo
PSG	Gel de secreção de promastigotas ( <i>Promastigote Secretory Gel</i> )
S.E.M.	Erro padrão das médias ( <i>Standard Error Mean</i> )
SFB	Soro fetal bovino
TAG	Triacilglicerol ( <i>Triacylglycerol</i> )
TLC	Cromatografia em camada fina ( <i>Thin-layer chromatography</i> )
WHO	Organização Mundial de Saúde ou OMS ( <i>World Health Organization</i> )



# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1. As leishmanioses

### 1.1.1. Biologia

As leishmanioses são causadas por protozoários unicelulares pertencentes à Ordem Kinetoplastida, Família Trypanossomatidae, definidos pela presença de um flagelo e o cinetoplasto, organela rica em DNA mitocondrial. O gênero *Leishmania*, é subdividido em dois subgêneros, *Leishmania* e *Viannia* (STEVERDING, 2017). Conforme Shaw (2006), as três principais espécies encontradas no Brasil são a *Leishmania (Leishmania) amazonensis*, *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi* e a *Leishmania (Viannia) brasiliensis*.

Quanto a morfologia *Leishmania* possui duas formas principais: a forma amastigota caracterizada como células ovóides, imóveis e sem flagelo aparente encontradas em macrófagos de mamíferos e a forma promastigota percebida por células alongadas, flageladas com grande mobilidade e é encontrada no intestino do vetor. A forma promastigota pode ser dividida em: procíclica, que é a fase proliferativa; e metacíclica, que é a forma mais conhecida caracterizar a fase infectiva no ciclo do parasita e pode ser mantida sob condições artificiais em meios de culturas especiais para manter a infectividade (Figura 1) (SACKS, 1989; BATES, 1994).

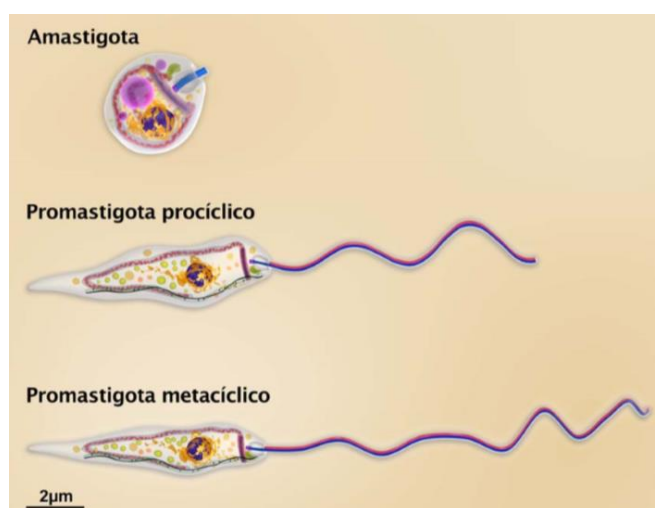


Figura 1. Representação dos principais estágios do desenvolvimento de *Leishmania (L.) amazonensis* (TEIXEIRA, 2013).

Os parasitas do gênero *Leishmania* são transmitidos através da picada do vetor (fêmea), um inseto pertencente à Ordem Diptera, Família Psychodidae, Subfamília Phlebotominae, gêneros *Phlebotomus*, *Lutzomyia*, dentre outros. A Subfamília caracteriza o

nome comum flebotomíneo, já o gênero *Phlebotomus*, o termo flebótomo, que também é utilizado como nomenclatura ao referir-se a espécies contidas na Subfamília Phlebotominae.

São exemplos de vetores endêmicos no Brasil *Lutzomyia longipalpus*, *Lutzomyia umbratilis*, *Lutzomyia flasvicutellata* e *Lutzomyia whitmani* (TEIXEIRA, 2013). Conforme Bates (2017), a disseminação das leishmanioses depende das características das espécies de parasitas, das características ecológicas locais dos locais de transmissão, da exposição atual e passada da população humana ao parasita e do comportamento humano. Segundo *World Health Organization* (WHO, ou Organização Mundial de Saúde, OMS) cerca de 70 espécies de animais, incluindo humanos, foram encontrados como hospedeiros naturais de parasitas como *Leishmania*.

Normalmente durante a alimentação, os flebotomíneos não infectados obtêm sangue através da probóscide, que passa da faringe ao intestino médio através da válvula cibarial ou estomodeal, onde é digerido. A infecção do vetor ocorre durante o repasto sanguíneo, quando a fêmea do flebótomo (hematófaga) pica um hospedeiro infectado e ingere o plasma sanguíneo que contém especialmente macrófagos infectados, e consequentemente formas amastigotas de *Leishmania*. Após o repasto sanguíneo do vetor, ocorre o rompimento da membrana dos macrófagos ingeridos que ainda não tinham sofrido lise no corpo do hospedeiro. Em flebotomíneos infectados parasitos como *Leishmania* se ligam à valva estomodeal e na região anterior do intestino, ocorre a diferenciação das formas amastigotas em promastigotas procíclicos no interior da matriz peritrófica. Para os promastigotas migrarem até o epitélio do trato digestório, rompem a matriz peritrófica, com finalidade de multiplicação e aderência (pelo flagelo). Logo após a proliferação, migram para da região anterior do intestino até a válvula estomodeal, onde se aglomeram e sofrem um processo de diferenciação, denominado metaciclógênese. Ao mesmo tempo, secretam proteofosfoglicano filamentoso (fPPG) que se condensa para formar o gel de secreção de promastigotas (PSG) que obstrui o intestino médio e faringe. O bloqueio de PSG força a válvula estomodeal a abrir, permitindo que parasitos (e gel) atinjam a faringe e o intestino anterior, permitindo que o sangue se misture com PSG durante o repasto sanguíneo e levado de volta a faringe. Como a PSG é altamente solúvel, quando o sangue é eventualmente sugado desobstrui a barreira de parasitos (e gel). Uma proporção de parasitas do intestino médio e PSG são regurgitadas por refluxo no interior da derme e/ou bolha de sangue no hospedeiro vertebrado. (Figura 2, dos passos 1 até 7) (ROGERS, 2012; SACKS & PERKINS, 1984; SCHLEIN, 1992).

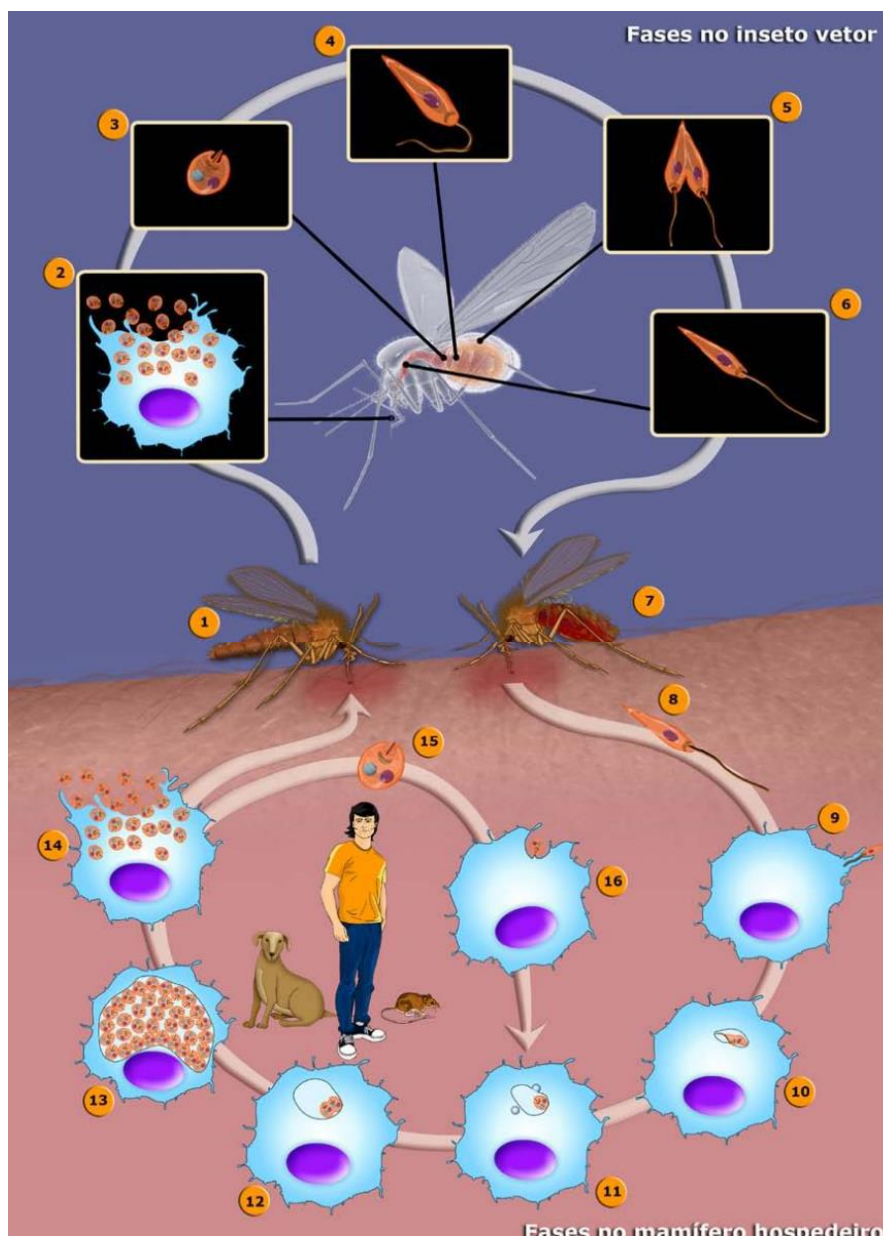


Figura 2. Ciclo de vida da *Leishmania (L.) amazonensis*. (TEIXEIRA, 2013)

Segundo Rogers (2009) a infecção nos hospedeiros vertebrados acontece no momento em que flebótomo fêmea infectada pica o mamífero, inoculando as formas promastigotas metacíclicas (forma infectiva) durante o repasto sanguíneo. Bates (2018) afirma que durante os primeiros dias de infecção, o parasita está mais vulnerável às respostas imunes inatas do hospedeiro e à picada de flebotomíneos. Isso é um impasse para os flebotomíneos, uma vez que eles causam mais danos à pele ao dilacerar capilares da derme superior com sua probóscide em forma serrilhada para se alimentar numa bolha de sangue. Isso significa que o PSG e a saliva do vetor operam em um local que receberá uma resposta inflamatória na tentativa de reestabelecer a homeostase no tecido. Conforme Rogers (2012) foi descoberto

que o PSG foi capaz de influenciar fortemente o recrutamento de macrófagos por neutrófilos em conjunto com a saliva. Desde então percebe-se que *Leishmania spp* trabalha de forma sinérgica para localizar a célula hospedeira potencial da infecção com auxílio da própria picada do flebotomíneo, saliva e PSG do parasita. Conforme Teixeira (2013) formas promastigotas metacíclicas são primitivamente fagocitadas pelos neutrófilos e macrófagos e no interior do vacúolo parasitóforo é iniciada a diferenciação em formas amastigotas na membrana interna do vacúolo. Em células como macrófagos, amastigotas se multiplicam por divisão binária tomando grande parte do citoplasma. Já em neutrófilos, amastigotas não se multiplicam em seu interior. Após sucessivas replicações das formas amastigotas, as membranas do vacúolo parasitóforo e macrófago se rompem liberando os amastigotas que poderão ser fagocitados por outros macrófagos ou serem sugados por uma nova fêmea de flebótomo durante o repasto sanguíneo (Figura 2, dos passos 7 até 16). Conforme Bates (2018) a partir da segunda busca por ingestão de sangue ocorre um novo ciclo de multiplicação que leva a uma população substancialmente aumentada de promastigotas metacíclicas e promastigotas procíclicas, ambos contribuindo para o aumento da transmissão.

### 1.1.2. Epidemiologia

As leishmanioses estão entre as doenças mais negligenciadas do mundo que afetam os humanos. No continente americano, o Brasil é o país com a maior incidência estimada de leishmanioses nas formas visceral e cutâneas (PAHO WHO Brazil, 2017).

As leishmanioses são causadas por protozoários parasitas de mais de 20 espécies de *Leishmania*. Sabe-se que mais de 90 espécies de flebotomos transmitem as leishmanioses. Conforme WHO (2018) existem quatro principais formas de manifestação da doença: visceral, cutânea, cutânea difusa e mucocutânea (Tabela 1). Corroborando, a Tabela 1 mostra que dentre as principais espécies de *Leishmania*, para cada uma das espécies há associação direta a um quadro clínico diferente, mas segundo Kaye & Scott (2011) pode-se considerar a existência de, pelo menos, cinco formas clínicas diferentes causadas pelas principais espécies brasileiras, *Leishmania (Viannia) braziliensis*, *Leishmania (Leishmania) amazonensis* e *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi*, como as formas cutâneas, mucocutânea, cutânea difusa, visceral (ou Calazar) e lesão dérmica pós-calazar. Já a figura 3 mostra a distribuição geográfica da leishmaniose cutânea e mucocutânea em todo o mundo (WHO, 2015).

Tabela 1. Distribuição das principais espécies de *Leishmania* em correlação ao tipo de doença. Conteúdo adaptado de WHO (2018) e Teixeira (2013).

Subgêneros →	<i>Leishmania</i>		<i>Viannia</i>
As leishmanioses	Eurásia e África	Américas	Américas
<b>Visceral</b> Acentuado tropismo do parasito pelas vísceras. Também conhecida como Calazar, pode ser fatal. É caracterizada por crises irregulares de febre, perda de peso, aumento do baço e do fígado e anemia. A maioria dos casos de leishmaniose visceral ocorre no Brasil, na África Oriental e no Sudeste Asiático. A incidência anual de leishmaniose visceral está entre 50 mil a 90 mil novos casos em todo o mundo.	<i>L. donovani</i>  <i>L. infantum</i>	<i>L. infantum</i> <i>chagasi</i>	
<b>Cutânea</b> Lesão cutânea principalmente úlceras, em partes expostas do corpo. Com maior incidência nas Américas, na bacia do Mediterrâneo, no Oriente Médio e na Ásia Central. Estima-se que ocorram 1 milhão de novos casos de leishmaniose cutânea anualmente. A epidemiologia nas Américas é muito complexa, com variações nos ciclos de transmissão, hospedeiros vertebrados, vetores flebotomíneos, manifestações clínicas, resposta à terapia, e as múltiplas espécies de <i>Leishmania</i> circulantes numa mesma área.	<i>L. major</i>  <i>L. tropica</i>  <i>L. aethiopica</i>	<i>L. infantum</i> <i>chagasi</i>  <i>L. pifanol</i>  <i>L. mexicana</i>  <u><b><i>L. amazonensis</i></b></u>	<i>L. braziliensis</i>  <i>L. guyanensis</i>  <i>L. panamensis</i>  <i>L. peruviana</i>  <i>L. lainsoni</i>  <i>L. naiffi</i>  <i>L. lindenberg</i>  <i>L. shawi</i>
<b>Cutânea difusa</b> Lesões crônicas e disseminadas que se assemelham à lepra. Não há cura disponível.	<i>L. aethiopica</i>	<i>L. mexicana</i>  <u><b><i>L. amazonensis</i></b></u>	
<b>Mucocutânea</b> Destruição parcial ou total das membranas mucosas do nariz, boca e garganta. Mais de 90% dos casos de leishmaniose mucocutânea ocorrem na Bolívia, no Brasil, na Etiópia e no Peru			<i>L. braziliensis</i>  <i>L. panamensis</i>

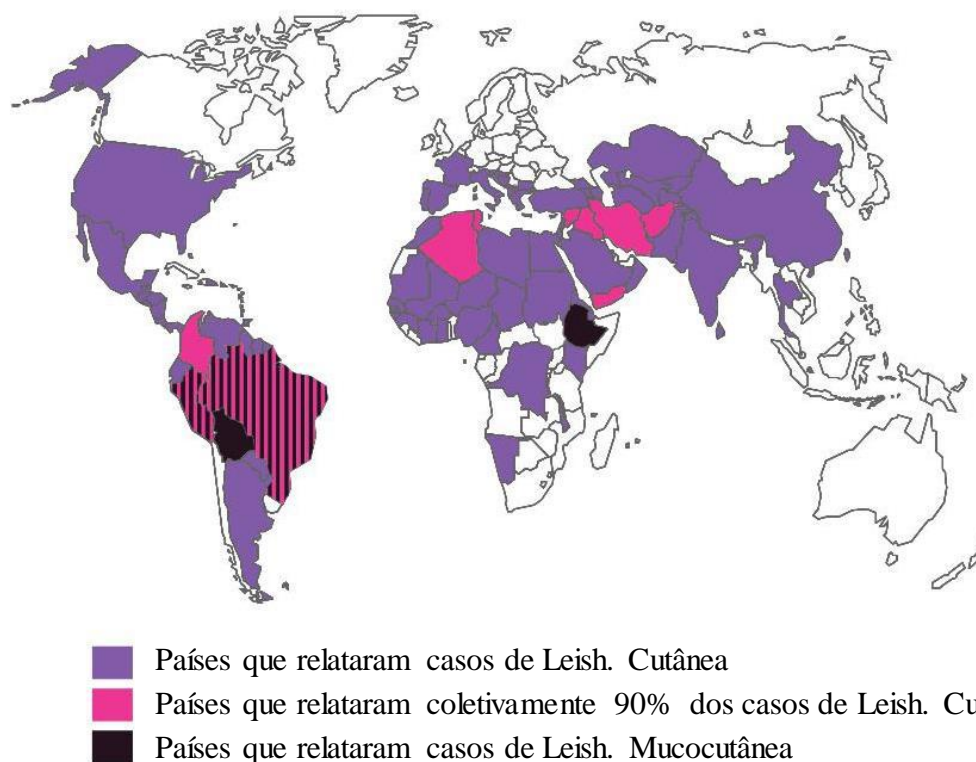


Figura 3. Situação epidemiológica da Leishmaniose Cutânea e Mucocutânea, 2015. Adaptado de: WHO <[http://www.who.int/leishmaniasis/Unveiling\\_the\\_neglect\\_of\\_leishmaniasis\\_infographic.pdf?ua=1](http://www.who.int/leishmaniasis/Unveiling_the_neglect_of_leishmaniasis_infographic.pdf?ua=1)>.

No Brasil são relatadas altas taxas de coinfeção por *Leishmania* e pelo Vírus da imunodeficiência humana (*Human Immunodeficiency Virus*, HIV). As pessoas coinfectadas com *Leishmania* e HIV têm alta chance de desenvolver a doença clínica completa o que agrava a ocorrência de recaída e mortalidade. O tratamento antirretroviral reduz o desenvolvimento da doença, diminui as recaídas e aumenta a sobrevida dos pacientes coinfectados (WHO, 2018; ALVES, 2015).

## 1.2. Modelos murinos e sua importância para o estudo das leishmanioses

Com intuito de compreender infecções com as quais os humanos são acometidos e assim investigar mecanismos imunológicos, bioquímicos e genéticos de resistência frente aos parasitas intracelulares como *Leishmania*, são utilizados modelos de interações parasitárias experimentais inoculadas em diferentes linhagens de camundongos - seja *in vitro* ou *in vivo*. As diferentes linhagens utilizadas são capazes de mimetizar a infecção em humanos (CONRAD, 2007; SCOTT & SCHARTON, 1994).

Quando camundongos da linhagem BALB/c (Figura 4) foram infectados com *Leishmania (L.) major*, eles apresentaram doença progressiva e crônica, pois são mais suscetíveis a infecção (SCOTT & SCHARTON, 1994; FONSECA, 2003). Entretanto, camundongos das linhagens C57BL/6, C3H/HeJ e CBA são mais resistentes e podem contornar a infecção por *Leishmania (L.) major* (FONSECA, 2003). O perfil de resistência à infecção por *Leishmania (L.) major* está associado ao desenvolvimento de uma resposta tipo Th1, enquanto o padrão de susceptibilidade é decorrente de uma resposta Th2. Assim o uso de camundongos da linhagem BALB/c é um modelo experimental mais fiel a futuros estudos em *Homo sapiens sapiens*.



Figura 4. Foto representativa de um camundongo (*Mus musculus*) sadio da linhagem de BALB/c.

Os trabalhos de Conrad (2007), Fonseca (2003) e Scott & Scharton (1994) certamente serviram de base para pesquisas aplicadas como a vacina desenvolvida por Martins e colaboradores (2016), o estudo mostra que uma nova vacina baseada em epítomos específicos de células T em BALB/c foi capaz de induzir proteção contra a infecção por *Leishmania (L.) amazonensis* para a mesma linhagem de camundongos.

### **1.3. Metabolismo de lipídios**

#### **1.3.1. Estrutura e função dos lipídios**

Os lipídios agregam inúmeras formas de compostos químicos, e são unidos/definidos por sua hidrofobicidade. Os lipídios podem ser classificados quanto à funcionalidade, como armazenamento (ácidos graxos, glicerolipídios e ésteres), estrutura de membranas (glicerofosfolipídios, esfingolipídios e esteróis), sinalização e cofatores (fosfatidilinositóis, eicosanoides, esteroides e vitaminas).

O ácido graxo (FA, do inglês *Fatty Acid*) é encontrado no sangue complexado a apolipoproteína, no interior de células dentro de gotículas lipídicas e também como componente de lipídios mais complexos. Os glicerolipídios são compostos de um a três ácidos graxos, cada um em ligação éster com uma molécula de glicerol, como o monoacilglicerol (MAG), o diacilglicerol (DAG) e o triacilglicerol (TAG) que em sua maioria serve como depósito de



energia. Os esteróis têm um sistema de anel tetracíclico, com uma ligação dupla em um dos anéis e um grupo hidroxila livre. Encontram-se tanto como colesterol livre (CHO), onde tem um papel essencial na manutenção da fluidez da membrana, quanto na forma de colesterol esterificado (CHOE) que é armazenado intracelularmente. Esses esteróis circulam pela corrente sanguínea em carreadores proteicos como lipoproteínas. (BAYNES, 2010; NELSON & COX, 2014).

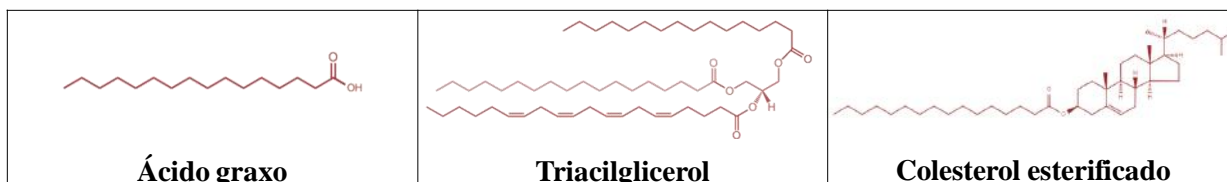


Figura 5 Representação esquemática de um ácido graxo, um triacilglicerol e um colesterol esterificado (LipidMaps.org).

### 1.3.2. Metabolismo lipídico em macrófagos murinos e *Leishmania*

Para a sobrevivência do parasito, *Leishmania (L.) amazonensis*, são manipulados os mecanismos moleculares da resposta imune dos macrófagos para que esse consiga subsistir no hospedeiro vertebrado (GOMES, 2015; ALVES, 2015).

Parasitas do gênero *Leishmania*, dentre outros da Família Trypanosomatidae, não possuem vias completas de biossíntese e degradação de lipídios, portanto, necessitam adquirir essas macromoléculas dos hospedeiros. Embora na literatura seja demonstrada a endocitose de metabólitos externos do hospedeiro, não são descritos todos os meios moleculares de como ocorre essa captação dentre a ampla pluralidade de classes lipídicas. Assim como não é caracterizado em que momentos do ciclo de vida de *Leishmania spp.* ocorre maior indução a mobilidade de lipídios (DE CICCIO, 2014; CUNHA-E-SILVA NL., 2002; FURLONG, 1989; BERMAN, 1984; MORITA, 2000).

Foi afirmado por Spath (2003) que em *Leishmania* faz a síntese de glicosilfosfatidilinositol, incluindo lipofosfoglicanos ancorados, importantes para a especificidade do hospedeiro e sobrevivência do parasita no flebotomíneo vetor, e também é sugerido que isso module a interação inicial com o hospedeiro vertebrado.

Foi demonstrado por Henriques (2003) que os fosfolipídios de macrófagos derivados da medula óssea de camundongos suíços são transferidos para o vacúolo parasitóforo contendo *Leishmania (L.) amazonensis*, em especial fosfolipídios como a lisofosfatidilcolina, proveniente da quebra da fosfatidilcolina, justapostas aos fagolisossomos, para que o vacúolo



parasitóforo seja formado. Além disso, ao analisar a composição lipídica da membrana plasmática isolada dos macrófagos murinos foram encontrados em maioria classes de fosfolípidios como a fosfatidilcolina e a fosfatidiletanolamina. *Leishmania spp* induz a presença de lipases tais como a fosfolipase A<sub>2</sub>, que promove a quebra da fosfatidilcolina em lisofosfatidilcolina e ácido araquidônico, que é precursor da prostaglandina E<sub>2</sub>. Assim esse aumento dos níveis de fosfatidilcolina reflete indiretamente sobre a fosfolipase A<sub>2</sub> dos macrófagos para assim equilibrar a produção prostaglandina E<sub>2</sub> e ceder lipídios ao vacúolo parasitóforo. Apoiando a vertente de que o parasita modula o metabolismo de lipídios do hospedeiro em prol da sua sobrevivência.

Lecoeur (2013) mostrou através de micrografias que leucócitos dendríticos mieloides de camundongos C57BL/6 parasitados por formas amastigotas de *Leishmania (L.) amazonensis* tiveram maior captação de ácido oleico em seus corpúsculos lipídicos em comparação a células controle. Além disso, tanto leucócitos das linhagens de camundongos C57BL/6 e DBA/2 infectados por *Leishmania (L.) amazonensis* tiveram modulações em suas assinaturas transcricionais, correlacionadas a regulação positiva de Receptor gama ativado por proliferadores de peroxissomos (do inglês, *Peroxisome Proliferator Activated Receptor Gamma*, PPAR $\gamma$ ) — que possui três isoformas conhecidas  $\alpha$ ,  $\beta/\delta$  e  $\gamma$  — e essa é de particular relevância para a biologia dos adipócitos, pois é o regulador chave da adipogênese e do processo de lipogênese em adipócitos maduros. Também foi visto aumento na transcrição de enzimas como Fosfatase ácido fosfatídica 2B (do inglês, *phosphatidic acid phosphatase type 2B*, PPAP2b) Acil-CoA: colesterol aciltransferase (do inglês, *acetyl-CoA acetyltransferase 2*, ACAT 2), Acil-CoA: diacilglicerol aciltransferase 1 (do inglês, *diacylglycerol O-acyltransferase 1*, DGAT1), e Acil-CoA: diacilglicerol aciltransferase 2/3 (do inglês, *diacylglycerol O-acyltransferase 2-like 3*, DGAT2/3), que em conjunto promovem a síntese de triacilglicerol e colesterol esterificado. Conforme suas análises, a geração desses lipídios tende a ocorrer de forma peculiar porque não derivaram de enzimas da síntese *de novo*, mas do aumento da importação de constituintes-chave, como ácidos graxos e colesterol, do meio extracelular, e a modulação positiva de transcritos envolvidos em sua (re) esterificação, como triacilglicerol e colesterol esterificado.

Rabhi (2016) fornece novas abordagens sobre a origem das gotículas lipídicas que são direcionadas para a proximidade de parasitas de *Leishmania spp*. Sugere-se que a formação de gotículas lipídicas é de origem celular, dependente de estímulo. Foi demonstrado que tanto os

parasitas podem captar gotículas de lipídios do macrófago, como podem eles mesmos produzir no interior do vacúolo parasitóforo.

Segundo Rodríguez (2017), os macrófagos derivados da medula óssea da linhagem de camundongos C57BL/6 infectados com *Leishmania (L.) infantum* apresentam maior número de corpúsculos lipídicos totais em relação aos macrófagos não infectados. Inclusive os maiores corpúsculos lipídicos foram vistos principalmente dentro de vacúolos parasitóforos. Esses resultados contrastam com os de macrófagos BALB/c infectados por *Leishmania (L.) infantum*, nos quais os únicos corpúsculos lipídicos são derivados de parasitas, e não de origem de macrófagos (ARAUJO-SANTOS, 2014 apud RODRÍGUEZ, 2017). Visto isso, seu estudo apoia um modelo em que a expressão e o papel dos corpúsculos lipídicos na infecção, dependem da combinação específica de interações parasito *versus* hospedeiro.

## 2. JUSTIFICATIVA

Sabe-se que espécies contidas no gênero *Leishmania* possuem singularidades ao manifestar distintas formas de manipulação do hospedeiro vertebrado para sucesso na disseminação da infecção (aguda ou crônica).

Os principais modos de atuação no combate as leishmanioses estão com foco no controle do díptero flebotomíneo vetor, pelo uso de inseticidas, e eutanásia de hospedeiros reservatórios como cães (*Canis lupus familiaris*), mesmo sendo amplamente aceita a vacina para a leishmaniose canina.

Os lipídios são protagonistas em funções primordiais nas células, visto que, compõem as membranas celulares, armazenam energia sob a forma de triacilglicerol e colesterol esterificado em lipoproteínas e gotículas lipídicas, são essenciais na geração moedas energéticas via  $\beta$ -oxidação de ácidos graxos, são precursores de importantes hormônios esteroides e podem participar como de vias sinalização celular.

No geral os protozoários dependem de lipídios, e não possuem vias completas de conversão em lipídios mais complexos. Assim precisam subsistir num hospedeiro para que ocorra seu desenvolvimento e multiplicação. Mesmo com possibilidade de sintetizar a maioria de seus lipídios, há uma tendência nesses parasitas em captarem lipídios de seu hospedeiro ou manipular as vias de biossíntese e/ou degradação de lipídios para adquiri-los. Apesar disso, só foram percebidas nuances dos mecanismos que governam essa manipulação do metabolismo de lipídios do hospedeiro.

Em posse desses argumentos, este trabalho se faz imprescindível em esforços pelo entendimento do metabolismo de lipídios neutros, em especial os lipídios envolvendo ácidos graxos em sua composição. A fim de reportar indagações sobre o que acontece com o metabolismo lipídico de células do sistema imune do hospedeiro vertebrado quando é submetido a interação parasitária por *Leishmania (L.) amazonensis*.

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1. Objetivo Geral**

Estudar o metabolismo de lipídios em macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c durante a infecção com *Leishmania. (L.) amazonensis*.

#### **3.2. Objetivos Específicos**

- ♦ Determinar a biossíntese de lipídios a partir de ácido palmítico-<sup>3</sup>H
- ♦ Analisar os lipídios sintetizados pelos macrófagos infectados;
- ♦ Determinar a composição de ácidos graxos em macrófagos infectados.

## **4. MATERIAL & MÉTODOS**

### **4.1. Cultivo e manutenção do modelo experimental**

#### **4.1.1. Animais**

Camundongos BALB/c entre 8-12 semanas de idade foram mantidos no laboratório de Imunologia Veterinária (LIV) do Instituto de Veterinária da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (IV-UFRRJ) e seu uso aprovado conforme as normas do CONCEA (Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal) pela CEUA (Comissão Ética de Uso Animal) — IV nº 5306180618.

#### **4.1.2. Obtenção de macrófagos murinos**

Camundongos BALB/c foram inoculados com 1,5mL de tioglicolato a 3%. Após três dias, os macrófagos peritoneais foram obtidos através da lavagem da cavidade peritoneal com meio *Roswell Park Memorial Institute 1640* (RPMI 1640) e plaqueados em lamínulas de vidro redondas de 13 mm<sup>2</sup> em placas de 24 poços (2,0 x 10<sup>5</sup>/poço) e incubados a 35°C/5% CO<sup>2</sup> por 2 horas. As células não aderentes foram removidas pela lavagem dos poços com tampão fosfato-salino (*phosphate buffered saline*, PBS) e incubadas por 24 horas em meio RPMI 1640 suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB).

## 4.2. Protocolo experimental – Interação parasitária em macrófagos murinos

Macrófagos estimulados com tioglicolato de camundongos BALB/c foram obtidos conforme descrito acima. As células foram infectadas com formas promastigotas de *Leishmania (L.) amazonensis* em fase estacionária de crescimento, em uma proporção de 10p:1m por 2 horas a 35°C/5% CO<sup>2</sup>. Após esse período, as células foram lavadas duas vezes com PBS para a retirada dos parasitas livres e incubadas novamente nas mesmas condições acima. Foi aguardado até 48 horas de interação parasitária — momento em que ocorre a máxima expansão do vacúolo parasitóforo nos macrófagos — para a coleta das amostras (Figura 6).

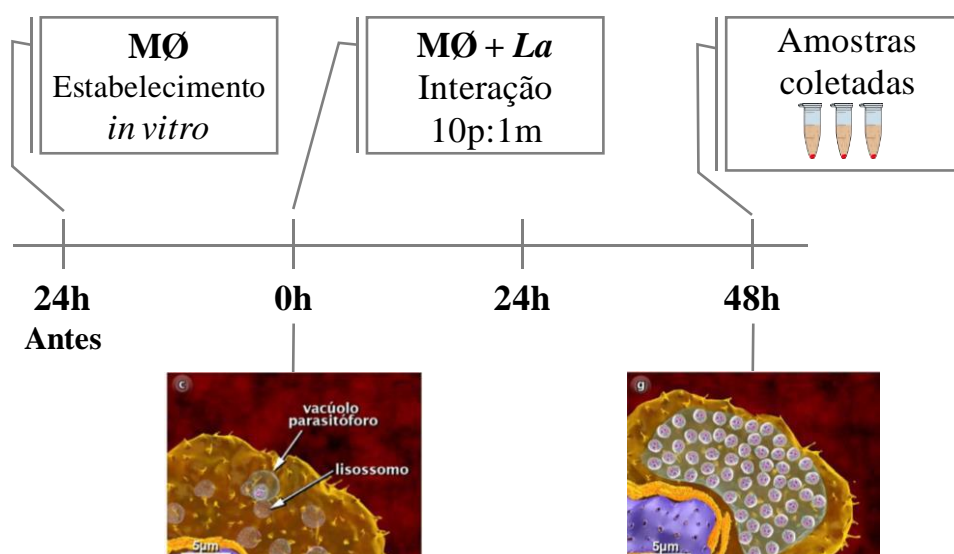


Figura 6. Esquema da interação parasitária *in vitro* entre macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c e *Leishmania (L.) amazonensis*. Lê-se: **MØ** = macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c; **MØ + La** = infecção **10p:1m** (10 parasitas para cada 1 macrófago) ou momento em que os macrófagos são infectados por *Leishmania (L.) amazonensis* (**La**). Representações de macrófagos adaptadas de Teixeira (2013).



## **4.4. Análise de lipídios**

### **4.4.1. Extração de lipídios**

Após as respectivas incubações, todo o conteúdo de células precipitadas (ou sobrenadante separado) foi submetido à extração de lipídios com adaptações do método Bligh e Dyer (1959), do seguinte modo: amostras foram dispostas em tubos cônicos de vidro e adicionados 1,9 mL da solução de solventes para extração de lipídios, metanol:clorofórmio:água (1:0,5:0,4 v/v). As amostras foram agitadas com duração de agitação de 5 segundos a cada 5 minutos, até que completasse uma hora. Após o período de agitação intermitente, as amostras junto a solução de extração foram centrifugadas por 20 minutos a 3.000 rpm. Assim foi coletado o sobrenadante contendo os lipídios, e reservado num 2º tudo. O precipitado do 1º tubo passou pela extração de lipídios novamente, 1,9 mL da mesma mistura de solventes, procedendo a agitação intermitente por mais uma hora, e mesmas condições de centrifugação. Os sobrenadantes das duas extrações foram unificados no 2º tubo e neles colocados 1 mL de água destilada e 1 mL de clorofórmio. Após 10 segundos de agitação, o material foi centrifugado em 3.000 rpm por 30 minutos e a fase inferior, orgânica, que contém os lipídios, foi separada com auxílio de seringa de vidro de 15 mL e disposta num 3º tubo cônico de vidro. O solvente foi evaporado por arraste de nitrogênio gasoso (N<sup>2</sup>). Os lipídios totais foram ressuspensos em 50 µL de clorofórmio.

### **4.4.2. Lipídios totais marcados com ácido palmítico-<sup>3</sup>H**

Após a extração de lipídios dos macrófagos peritoneais previamente marcados com <sup>3</sup>H-FA-BSA, os mesmos foram concentrados, ressuspensos em 50 µL de clorofórmio, e utilizado 10% do volume total da amostra (5 µL) para fazer a estimativa da quantidade do complexo <sup>3</sup>H-FA-BSA se manteve dentro das células controle ou experimental.

A alíquota de 10% da amostra foi inserida em tubos (Pico Pro Vial, 4 mL, PerkinElmer) junto a 1 mL de coquetel de cintilação (Optiphase Hisafe 3 - PerkinElmer). A radioatividade associada aos lipídios foi determinada por cintilação líquida utilizando o cintilador PerkinElmer TriCarb (Figura 8).

O contador de cintilação líquida quantifica a radiação estabelecendo a estimativa do quanto a amostra cintila em comparação aos seus padrões internos de cintilação - seja para radiação alfa, beta ou alfa e beta - emitida por isótopos como: carbono-14 (<sup>14</sup>C), fósforo-32



( $^{32}\text{P}$ ), e o utilizado no presente trabalho, o trítio ( $^3\text{H}$ ). Portanto gera o resultado em Contagens por minuto (CPMA) de radiação que compõe determinada amostra. Como a quantidade de CPMA depende da precisão do aparelho utilizado, em razão disso é necessário que ocorra uma conversão para uma unidade de radiação universal. Por conseguinte, os resultados em CPMA foram convertidos em Desintegrações por minuto (DPM) com auxílio de um padrão externo de contagem, a Curva de Quench para Trítio (Packard/PerkinElmer).

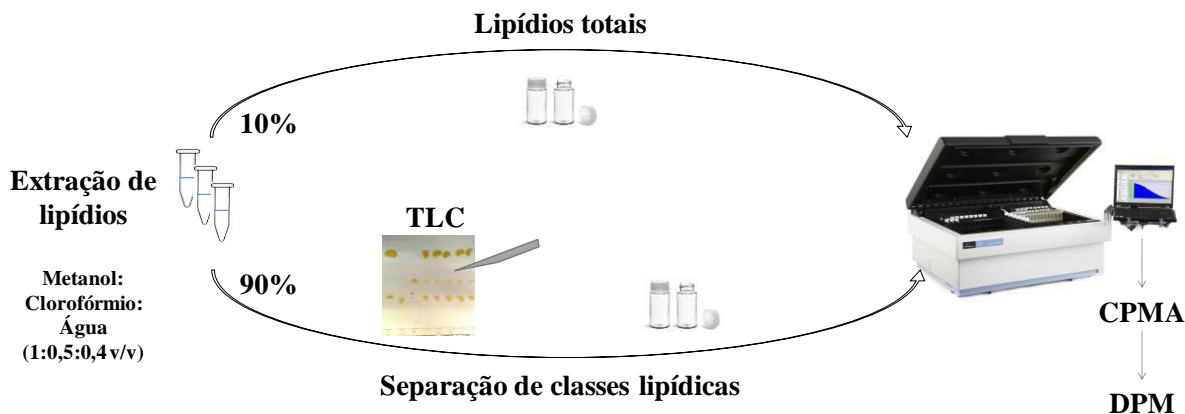


Figura 8. Otimização dos lipídios de amostras marcadas com  $^3\text{H}$ -FA-BSA e análises realizadas.

Em posse dos resultados em CPMA, a coluna do Índice Espectral convertido devido ao Padrão Externo (*transformed Spectral Index of the External Standard - tSIE*) das amostras foi interpolada à t-SIE da Curva de Quench que estava pareada ao percentual de eficiência da curva, com o auxílio do programa *GraphPad Prism* (v. 6.1, GraphPad Inc., CA, EUA). O programa gerou o percentual de eficiência das amostras (%Eficiência<sub>A</sub>). Assim a amostra foi corrigida:

$$DPM_A = \frac{CPMA_A}{\% Eficiência_A \times 100}$$

#### 4.4.3. Cromatografia em camada fina (TLC)

Com os lipídios dos macrófagos peritoneais previamente marcados com  $^3\text{H}$ -FA-BSA, já extraídos e ressuspensos em 50  $\mu\text{L}$  de clorofórmio, foi utilizado 90% do volume total da amostra (45  $\mu\text{L}$ ) para fazer o ensaio de cromatografia em camada fina (TLC) em placa de sílica (Silica Gel, 60F<sub>254</sub>, Merck KGaA., Frankfurt, DS, Alemanha), com suporte de alumínio, 20 x 20 cm.

Foi utilizado o método para separação de lipídios neutros, e o conjunto de solventes foi hexano:dietil éter:ácido acético (60:40:1 v/v) (VOGEL et al., 1962). Os lipídios foram designados em comparação com os seguintes padrões comerciais em concentrações de 25,0

µg aplicados na TLC (Avanti Polar Lipids Inc., Alabaster, AL, EUA): monoacilglicerol; 1,3 e 1,2 diacilglicerol; triacilglicerol; colesteril-oleato/colesteril-palmitato; e ácido oleico/palmítico.

A TLC foi corada por vapor de iodo (Merk) e os spots de lipídios correspondentes a classes de lipídios como ésteres de colesterol, monoacilglicerol, diacilgliceróis, triacilglicerol, e ácidos graxos livres foram raspadas, a sílica coletada e armazenada em tubos (Pico Pro Vial, 4 mL, PerkinElmer) junto a 1 mL de coquetel de cintilação Optiphase Hisafe 3 (PerkinElmer). A radioatividade associada aos lipídios foi determinada por cintilação líquida, conforme no item 4.3.2. Foi feita uma equivalência em do valor em DPM 90% para 100%, e gerada a figura 10.

#### **4.4.4. Cromatografia gasosa com Espectrometria de Massa (GC/MS)**

Para análise da composição de ácidos graxos, foi utilizada a técnica Cromatografia Gasosa com Espectrometria de Massa (GC/MS). As amostras foram obtidas conforme o tópico 4.2, a quantidade de células utilizadas foi de  $1,0 \times 10^6$  macrófagos peritoneais, em frasco de cultivo celular de 25 cm<sup>2</sup>. Foi reservado um frasco de cultivo celular para macrófagos controle, e outro para macrófagos infectados que detinha formas promastigotas de *Leishmania (L.) amazonensis* em fase estacionária de crescimento, em uma proporção de 10p:1m. O volume de meio de cultura em ambas as garrafas foi de 6 mL, além de terem sido mantidas na horizontal para melhor estabilidade no cultivo das células. Foi separado pellet contendo as células (lisado celular) e o sobrenadante (meio de cultivo celular do ensaio) das mesmas. Os lipídios totais foram extraídos os lipídios (vide tópico 4.4.1).

Os lipídios totais foram secos com N<sub>2</sub>, ressuspensos em tolueno (1 mL) num tubo cônico de vidro, e foi adicionado ácido sulfúrico 1% em metanol (2 mL). A mistura foi vedada e deixada *overnight* a 50 ° C. Foi adicionado 1 mL de cloreto de sódio 5% e os ésteres necessários foram extraídos duas vezes com 2 mL de hexano utilizando pipetas Pasteur para separar as camadas. O solvente foi removido numa corrente de azoto. O ácido nonadecaóico (C19:0), padrão interno, e o FAME (mistura de padrões de ácidos graxos, Supelco 37 Component FAME Mix, Sigma-Aldrich), padrão externo, seco e ressuspenso em 50 µL de hexano. A análise por GC/MS foi realizada num sistema Shimadzu GCMS-QP2010 Plus, utilizando HP Ultra<sup>2</sup> (5% fenilmetilpolisiloxano), Agilent (25 m x 0,20 mm x 0,33). O injetor foi ajustado a 250°C. A temperatura da coluna foi programada de 40 a 160°C a 30°C/min,

160-233°C a 1°C/min, 233-300°C a 30°C/min e mantida a 300°C por 10 min. O gás hélio foi utilizado como gás carreador com velocidade linear de 36,0 cm s<sup>-1</sup>. Um volume de 1 µL de amostra foi injetado no cromatógrafo. A ionização de elétrons (EI-70 eV) e um analisador de massa quadruplo, operaram em varreduras de 40 a 440 µm para a fração de ácidos graxos de cadeia longa. A interface foi ajustada a 240°C e a fonte de íons a 240°C para a fração de ácidos graxos de cadeia longa. Os componentes foram identificados comparando seus espectros de massa com os da biblioteca NIST05 contida no computador do espectrômetro de massa. Índices de retenção também foram usados para confirmar a identidade dos picos no cromatograma pela Supelco 37 Component FAME Mix (Sigma-Aldrich).

Os lipídios foram identificados através de comparação com os controles endógenos para ácidos graxos de cadeia longa (C19:0), estes são padrões comerciais em concentrações de 1,0 mg/mL (Avanti Polar Lipids Inc., Alabaster, AL, EUA) (Tabela 2):

Tabela 2 – Padrões comerciais para lipídios que sofreram a inserção de um éster de metila (nome sistemático). A identificação foi feita através de comparação com os controles endógenos para ácidos graxos de cadeia longa, os respectivos tempos de retenção em minutos *versus* intensidade, cujos espectros ficam armazenados no banco de dados digital do aparelho. (\*) padrão interno.

Tempo de retenção (min)	Composto		
	Esqueleto de carbono	Nome sistemático	Nome comum
10.817	C12:0	Dodecanoic acid, methyl ester	Ácido láurico
25.900	C16:0	Hexadecanoic acid, methyl ester	Ácido palmítico
36.342	C18:2n6c	9,12-Octadecadienoic acid (Z,Z)-, methyl ester	Ácido linoleico
36.817	C18:1n9c	9-Octadecenoic acid (Z)-, methyl ester	Ácido oleico
37.300	C18:1n9t	9-Octadecenoic acid, methyl ester, (E)-	Ácido eláidico
38.700	C18:0	Octadecanoic acid, methyl ester	Ácido esteárico
*45.825	*C19:0	*Nonadecanoic acid, methyl ester	*Ácido nonadecanóico
47.725	C20:4n6	5,8,11,14-Eicosatetraenoic acid, methyl ester, (all-Z)	Ácido araquidônico
49.125	C20:3n6	8,11,14-Eicosatrienoic acid, methyl ester	Ácido 8,11,14-eicosatrienóico
61.742	C22:6n3	4,7,10,13,16,19-Docosahexaenoic acid, methyl ester, (all-Z)	Ácido 4,7,10,13,16,19-docosahexaenóico
65.867	C22:1n9	13-Docosenoic acid, methyl ester, (Z)-	Ácido erúico

## 4.5. Análise estatística

Para ser empregada a análise estatística foram utilizados ensaios com média de três replicatas técnicas de três repetições sob as mesmas condições laboratoriais. Assim os resultados estão expressos como média  $\pm$  erro padrão da média (S.E.M.). As análises estatísticas dos dados foram realizadas por meio do software *GraphPad Prism* (v. 6.1, GraphPad Inc., CA, EUA). Os valores para cada grupo foram comparados pelo teste t de Student não pareado. As diferenças foram consideradas estatisticamente significativas quando  $p \leq 0,05$ .

## 5. RESULTADOS

### 5.1. A incorporação de ácido palmítico-<sup>3</sup>H

Para alcançar o objetivo de determinar a biossíntese de lipídios a partir de ácido palmítico-<sup>3</sup>H em macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c induzida pela infecção por *Leishmania (L.) amazonensis*, foi feito o ensaio de incorporação de ácido palmítico-<sup>3</sup>H comparando células controle (não infectadas) com células infectadas. Os resultados indicaram uma absorção significativa do ácido palmítico-<sup>3</sup>H presentes nos lipídios totais de macrófagos murinos infectados em comparação ao grupo controle ( $24.758,0 \pm 2.674,0$  vs.  $13.290,0 \pm 1.826,0$  DPM,  $p = 0,0240$ ).

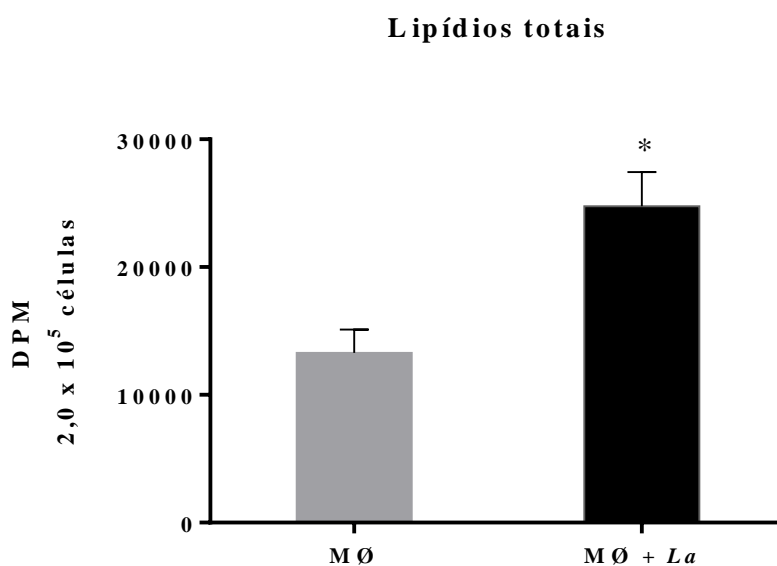


Figura 9. Lipídios totais marcados com ácido palmítico-<sup>3</sup>H em macrófagos murinos infectados com *Leishmania (L.) amazonensis*. Os macrófagos peritoneais ( $2,0 \times 10^5$ ) foram infectados com *Leishmania (L.) amazonensis* (10p:1m), incubados em RPMI com SFB 5%, na presença de  $1 \mu\text{Ci}$  de <sup>3</sup>H-FA-BSA. Em 48 horas após o início da infecção, as células foram retiradas, extraídos os lipídios e analisadas alíquotas da amostra. A barra cinza indica os macrófagos controle (sem interação parasitária) ( $n=3$ ) e a barra preta indica os macrófagos infectados ( $n=3$ ). Os valores representam a média  $\pm$  erro padrão. (\*) representa o valor de  $p < 0,05$  conforme o teste t de Student não pareado.

## **5.2. A captação e biossíntese do ácido palmítico-<sup>3</sup>H em lipídios neutros mais complexos**

Com o intuito de analisar os lipídios sintetizados pelos macrófagos infectados, lipídios extraídos das amostras foram submetidos à TLC, pois na figura 9 houve maior captação de ácido palmítico-<sup>3</sup>H nas células infectadas.

A figura 10 mostra, em DPM/2x10<sup>5</sup> células, as principais classes de lipídios neutros marcadas com ácido palmítico-<sup>3</sup>H em macrófagos murinos controle e infectados com *Leishmania (L.) amazonensis* em 48 horas de infecção. Assim, é possível observar um aumento expressivo da utilização de ácido palmítico-<sup>3</sup>H na biossíntese em classes lipídicas como triacilglicerol (3.590,0 ± 524,3 vs. 1.092,0 ± 525,7 DPM, p = 0,0282) e colesterol esterificado (1.919,0 ± 214,3 vs. 623,3 ± 186,6 DPM, p = 0,0103) em células infectadas frente as células controles, respectivamente. É possível perceber também o aumento significativo de ácidos graxos livres (9.208,0 ± 2.850,0 vs. 704,0 ± 118,0 DPM, p = 0,0407) nas células infectadas. Classes lipídicas como monoacilglicerol e diacilglicerol não apresentaram diferença significativa.

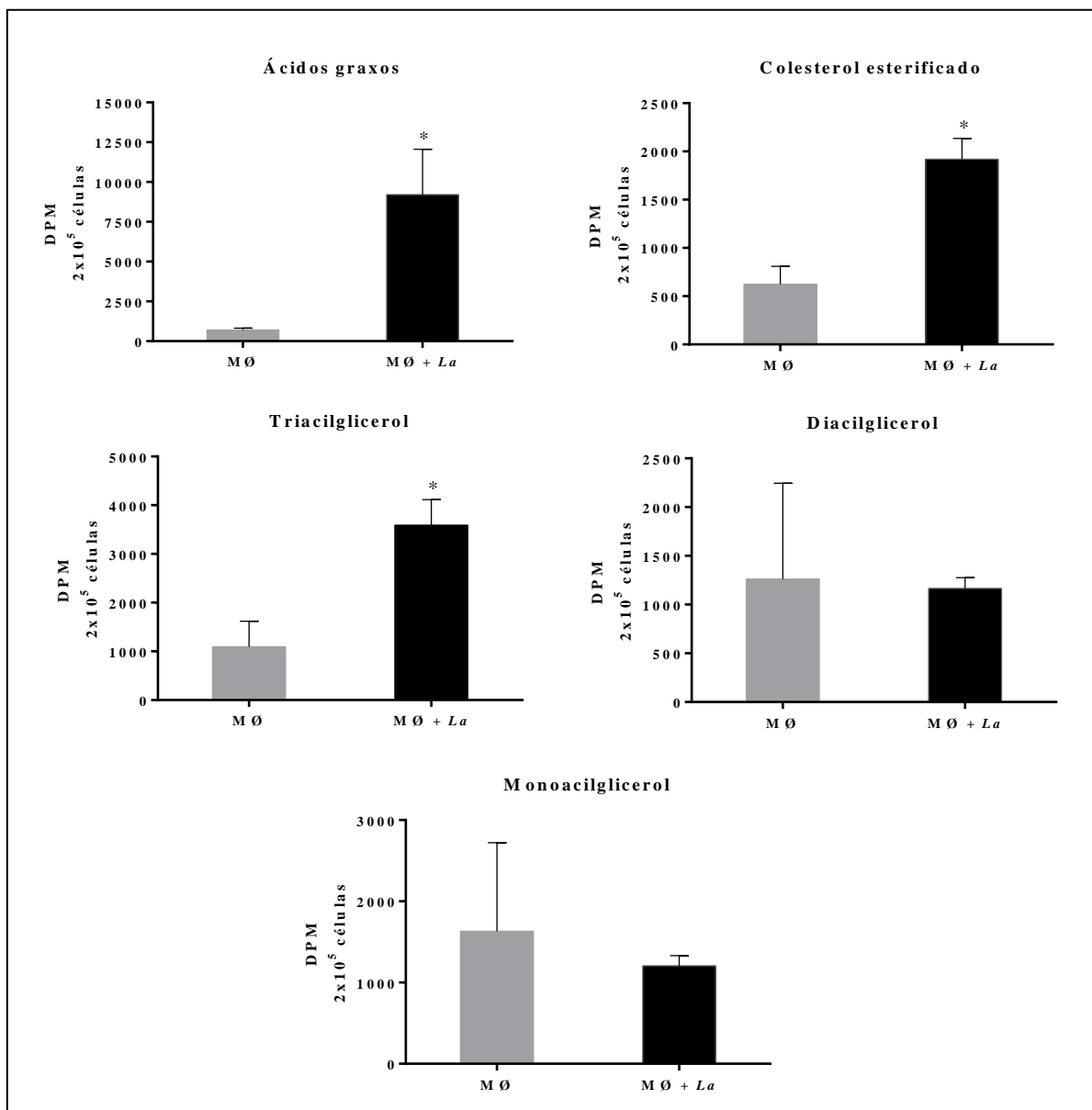


Figura 10. Classes lipídicas marcadas com ácido palmítico-<sup>3</sup>H em macrófagos murinos infectados com *Leishmania (L.) amazonensis*. Os macrófagos peritoneais (2,0x10<sup>5</sup>) foram infectados com *Leishmania (L.) amazonensis* (10p:1m), incubados em RPMI com SFB 5%, na presença de 1μCi de <sup>3</sup>H-FA-BSA. Em 48 horas após o início da infecção, as células foram retiradas, os lipídios foram extraídos e as classes lipídicas separadas por TLC. As barras cinzas indicam os macrófagos controle (sem interação parasitária) (n=3) e as barras pretas indicam os macrófagos infectados (n=3). Os valores representam a média ± erro padrão. (\*) representa o valor de p < 0,05 conforme o teste t de Student não pareado.

### 5.3. Caracterização de ácidos graxos de cadeia longa

Os ácidos graxos livres tiveram destaque significativo nos macrófagos infectados em relação aos controles (Fig. 10), apoiado nisso houve interesse em saber quais ácidos graxos compõem este modelo experimental. Como o conjunto de solventes utilizado na TLC não pode caracterizar totalmente os tipos de ácidos graxos – por apresentarem padrão de corrida muito semelhante – as amostras foram submetidas à GC/MS.

Ao final de 75 minutos de retenção da amostra no aparelho, obtive os gráficos apresentados nas figuras 11 e 12. Na figura 11 vê-se os cromatogramas com os picos de intensidade de área da massa durante o tempo de retenção da amostra no aparelho que caracterizam o perfil de ácidos graxos no lisado celular de macrófagos murinos infectados por *Leishmania (L.) amazonensis* e controles (não infectados), bem como o sobrenadante destas condições que também foi analisado. Já na figura 12 estão plotados os valores em  $\mu\text{g}$  de lipídios/ $1 \times 10^6$  macrófagos murinos.

Nas figuras 11 e 12, é nítido que há maior quantidade e diversidade de ácidos graxos nas análises de macrófagos murinos infectados por *Leishmania (L.) amazonensis*, seja no lisado celular (MØ+La) ou no sobrenadante em que essas células se estabeleceram. No lisado celular de macrófagos infectados são majoritários ácidos graxos como o esteárico (18:0), o ácido araquidônico (C20:4n6), o ácido 4,7,10,13,16,19-docosahexaenóico (22:1n9), o ácido palmítico (C16:0), e, os ácidos oleico (C18:1n9c) e linoleico (C18:2n6). No lisado celular de macrófagos murinos controles (não infectados), ácidos graxos como o esteárico (C18:0) e o erúcico (C22:1n9) são majoritários.



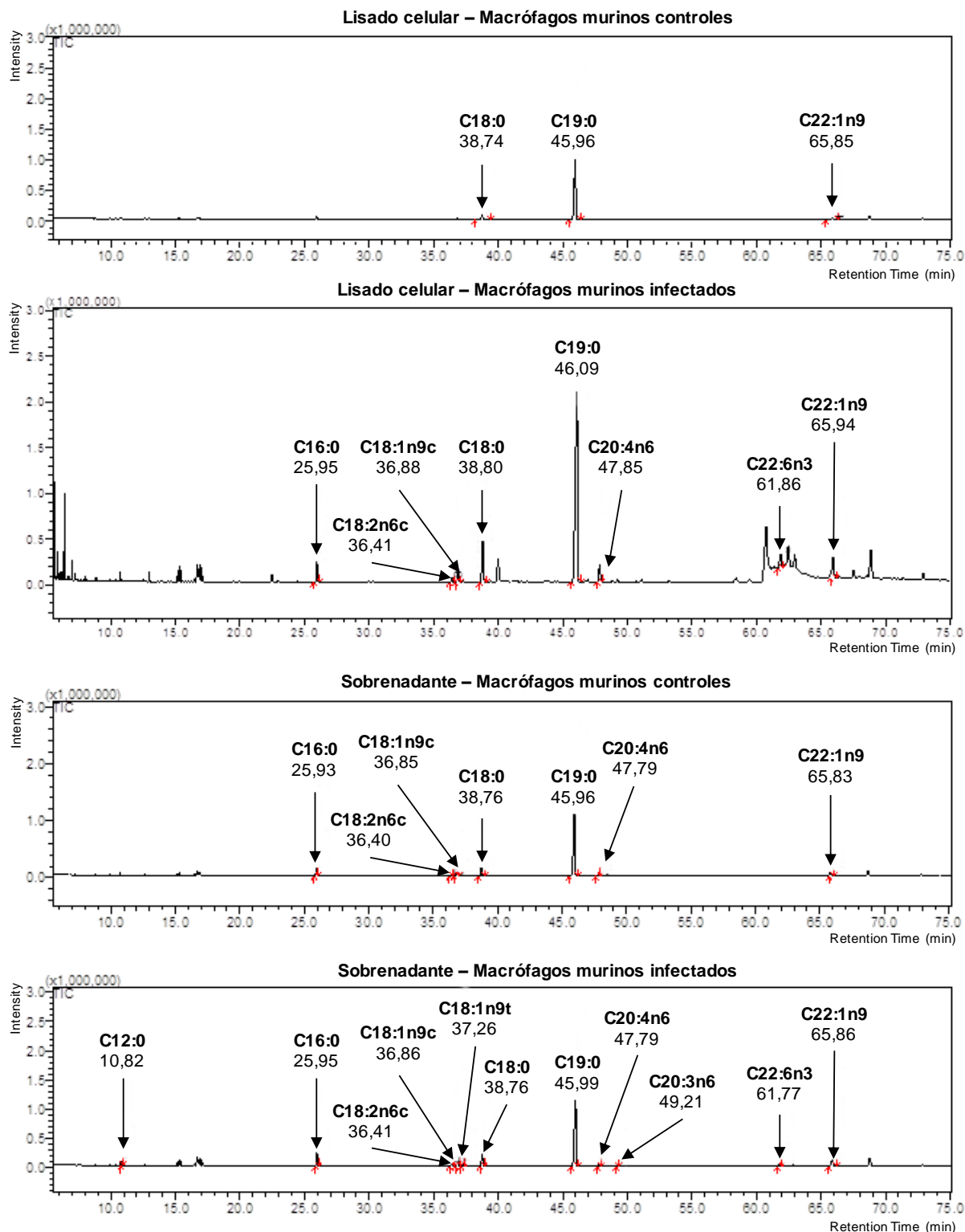


Figura 11. Cromatogramas referentes à caracterização de ácidos graxos em macrófagos murinos infectados por *Leishmania (L.) amazonensis* e controles (não infectados). Após macrófagos murinos sofrerem 48 horas de infecção por *Leishmania (L.) amazonensis* foi retirado o sobrenadante das células e reservado, e as células foram lavadas. Foi realizada a extração de lipídios das amostras, que passaram pela extração de ácidos graxos. As setas expressam os esqueletos de carbono: ácido láurico (C12:0), ácido palmítico (C16:0), ácido linoleico (C18:2n6c), ácido oleico (C18:1n9c), ácido elaídico (C18:1n9t), ácido esteárico (C18:0), padrão interno ácido nonadecanóico (C19:0), ácido araquidônico (C20:4n6), ácido 8,11,14-eicosatrienóico (C20:3n6), ácido 4,7,10,13,16,19-docosahexaenóico (C22:6n3), ácido erúico (C22:1n9) e seus respectivos tempos de retenção (em minutos), e indicam os picos correspondentes. Os cromatogramas são representativos de um experimento independente.

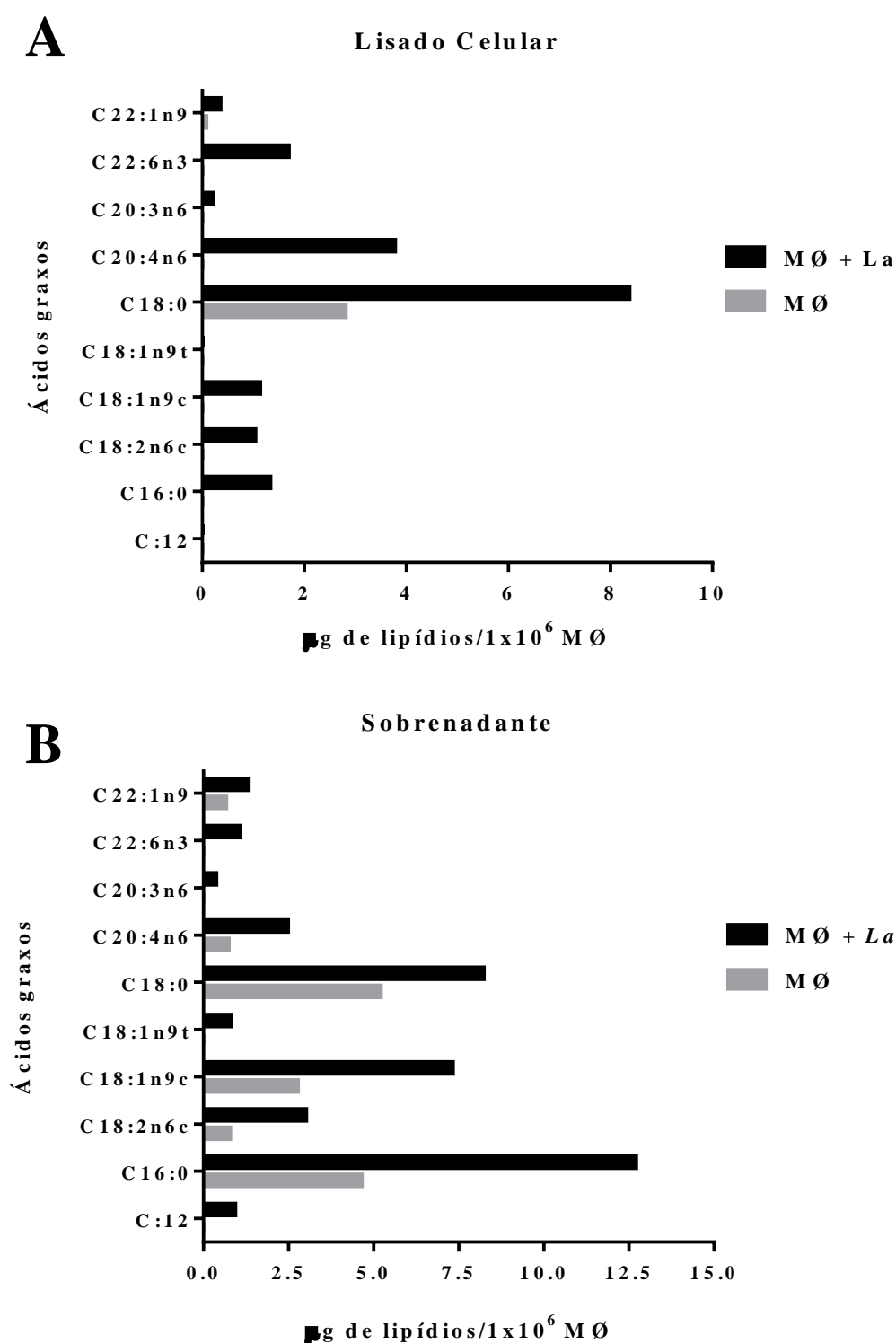


Figura 12. Caracterização de ácidos graxos em macrófagos murinos infectados por *Leishmania (L.) amazonensis* e controles (não infectados). Para melhor entendimento dos cromatogramas da figura 11 foi plotado o gráfico barras com os dados em µg de lipídios/1x10<sup>6</sup> macrófagos murinos. As barras cinzas indicam os macrófagos controle (sem interação parasitária) e as barras pretas indicam os macrófagos infectados. (A) Ácidos graxos que compõem o lisado celular de macrófagos murinos infectados por *Leishmania (L.) amazonensis* e controles (não infectados); (B) Ácidos graxos que compõem o sobrenadante células no modelo *in vitro* de macrófagos murinos infectados por *Leishmania (L.) amazonensis* e controles (não infectados). O eixo das abscissas expressa os esqueletos de carbono (vide figura 11). Dados representativos de um experimento independente.

## 6. DISCUSSÃO

Os protozoários do gênero *Leishmania* possuem particularidades ao manifestar distintas formas de manipulação do hospedeiro vertebrado para sucesso na disseminação da infecção seja ela cutânea, cutânea difusa, mucocutânea ou visceral, que podem ocorrer de maneira aguda ou crônica. Os principais modos de atuação no combate as leishmanioses estão com foco no controle do vetor flebotomíneo, pelo uso de inseticidas. Assim se faz necessário pesquisar os mecanismos de ação de *Leishmania spp* para então desenvolver métodos mais eficazes de combate a leishmaniose. (ALVES, 2015; GOMES, 2015; WHO, 2018).

Os lipídios desempenham funções primordiais em seres vivos. Os parasitas dependem de lipídios, e não possuem vias completas de conversão em lipídios mais complexos. Assim necessitam permanecer num hospedeiro para que ocorra seu desenvolvimento e multiplicação. Mesmo com possibilidade de criar a maioria de seus lipídios, há uma tendência nesses parasitas em captarem lipídios de seu hospedeiro ou manipular as vias de biossíntese e/ou degradação de lipídios para adquiri-los. Embora na literatura seja demonstrada a endocitose de metabólitos externos do hospedeiro, não são descritos todos os meios moleculares de como ocorre essa captação dentre a ampla pluralidade de classes lipídicas. Assim como não é caracterizado em que momentos do ciclo de vida de *Leishmania* ocorre maior indução a mobilidade de lipídios (BERMAN, 1984; CUNHA-E-SILVA, 2002; DE CICCIO, 2014; FURLONG, 1989; MORITA, 2000).

Na figura 12 deste trabalho foi possível perceber uma maior captação do ácido palmítico-<sup>3</sup>H e sua internalização nos macrófagos murinos, sendo significativamente maior em macrófagos murinos que foram infectados por *Leishmania (L.) amazonensis*. Este resultado corrobora com Henriques (2003) onde sugere que fosfolipídios captados pelos macrófagos infectados por *Leishmania (L.) amazonensis* são transferidos aos parasitas. Trabalhos similares como os de Henriques (2003), Lecoeur (2013), Rabhi (2016) e Rodríguez (2017) também mostraram, sob diferentes abordagens, uma maior quantidade de corpúsculos lipídicos em macrófagos murinos infectados por parasitos do gênero *Leishmania*, além disso o mesmo perfil foi observado por Mota (2014) em macrófagos murinos infectados por *Toxoplasma gondii*. Demonstrando que a presença de parasitos fagocitados por macrófagos murinos podem modular o metabolismo dos macrófagos desde estimular uma maior captação de metabólitos do meio de cultura, e até encaminha-los ao interior do vacúolo parasitóforo.

Os resultados da figura 10 mostram as alterações nas classes de lipídios neutros de macrófagos murinos infectados por *Leishmania (L.) amazonensis* em comparação aos macrófagos que não foram infectados. Ao separar os lipídios percebeu-se um aumento significativo da biossíntese classes lipídicas como triacilglicerol e colesterol esterificado a partir do precursor ácido palmítico- $^3\text{H}$ , isto em células infectadas frente às células controles, respectivamente. De Cicco (2014), demonstrou que formas promastigotas de *Leishmania (L.) amazonensis* são capazes de acumular colesterol total em seu citoplasma, além de esterificar o colesterol livre derivado da lipoproteína de baixa densidade (LDL), uma prova da existência da ACAT. Lecoecur (2013) e Rabhi (2016) mostraram através de técnicas de análise transcricional que há aumento de transcrição de ACAT e DGAT em leucócitos e macrófagos infectados por *Leishmania*, e também processos associados com um aumento na captação de ácidos graxos em C57BL/6 infectados por *Leishmania (L.) amazonensis*, mostraram modulação de transcritos envolvidos na geração extracelular de ácido fosfatídico e hidrólise de monoacilglicerol, bem como a geração de ácido graxo intracelular, captação e transporte. Então o colesterol esterificado aumentado pode ser proveniente da indução de *Leishmania (L.) amazonensis* sobre o metabolismo de lipídios do macrófago, mas também pode ter sido esterificado por enzimas dela mesma.

Em animais vertebrados, principalmente os adipócitos, armazenam grandes quantidades de triacilgliceróis na forma de gotículas lipídicas que fornecem energia e precursores biossintetizantes. Gotículas lipídicas compostas por glicerolipídios são observadas outras células de mamíferos, como macrófagos murinos e em maior quantidade em macrófagos murinos infectados por *Leishmania (L.) amazonensis* (RABHI, 2016) e além disso, podem ser observadas em protozoários da família Trypanossomatidae (CHAGAS-LIMA, 2016; KLUCK & REGIS, 2017). Estes contêm lipases, enzimas que catalisam a hidrólise de triacilgliceróis armazenados, liberando ácidos graxos livres para serem transportados aos sítios onde são necessários como combustível.

Já foi descrito, em mamíferos, que os ácidos graxos livres não esterificados circulam no sangue devido a ligação não covalente à albumina. Por isso não contêm o grupo carboxila carregado, tornando-se menos solúveis em água em comparação aos ácidos graxos livres. Na figura 10 é visto o aumento significativo desses ácidos graxos livres que pode ser explicado devido a dois fatores: o primeiro devido ao complexo  $^3\text{H}$ -FA-BSA ter sido captado pelas células e este foi mantido intracelularmente sem ser convertido noutros lipídios; o segundo fator é que o complexo  $^3\text{H}$ -FA-BSA pode ter sido captado pelas células, transformado em

outros lipídios ao longo da infecção e mesmo assim ter sofrido ação de lipases e retornou a sua forma de ácidos graxos livres, ou seja, que as vias de biossíntese e degradação de ácidos graxos estavam trabalhando de forma sinérgica, bem como as vias relacionadas a utilização destes metabólitos, que é uma hipótese em parte defendida por Lecoecur (2013). Além de estocagem dos ácidos graxos, os mecanismos do metabolismo para esta categoria poderiam estar relacionados a ser usados pelas formas amastigotas presentes no vacúolo parasitóforo para produzir energia via  $\beta$ -oxidação de ácidos graxos, um processo que é conhecido por ocorrer em *Leishmania (L.) major*, envolvendo várias enzimas que foram detectadas pelo sequenciamento do seu genoma (IVENS, 2005). Ácidos graxos também são importantes por estarem intimamente relacionados a formação de eicosanoides, compostos das prostaglandinas, leucotrienos, prostaciclina, tromboxanos e derivados dos ácidos graxos hidroxilados, e, assim estarem ligados a respostas de imunidade e inflamação.

Em consequência da diferença significativa em quantidade de ácido palmítico- $^3\text{H}$  entre macrófagos infectados vs. controles (figura 10) foi estimulada a curiosidade em caracterizar os ácidos graxos que compõem tais macrófagos. Com base em Nelson & Cox (2014) ao partir do princípio que é comum a produção de ácido palmítico a partir da enzima ácido graxo sintase (FAS), percebe-se que o ácido palmítico (C16:0) pode sofrer alongamento e tornar-se ácido esteárico (C18:0), que então passa por uma série de dessaturações para a formação de ácido oleico (C18:1), ácido linoleico (C18:2), e reparte-se em dois grupos i) formação de outros ácidos graxos poli-insaturados, como o ácido 4,7,10,13,16,19-docosaheptaenóico e ii) formação de ácido araquidônico (figura 13).

As figuras 11 e 12 expressam pela primeira vez resultados obtidos durante a caracterização do perfil de ácidos graxos de cadeia longa em macrófagos murinos infectados por *Leishmania (L.) amazonensis*, da mesma maneira que os macrófagos murinos controles (não infectados). No geral é possível perceber uma maior reserva de ácidos graxos em macrófagos murinos infectados (figura 12-A), e no sobrenadante dos macrófagos infectados foram detectadas concentrações altas de ácidos graxos, em relação aos macrófagos controle (figura 12-B).

De acordo com as figuras 14 e 15 vê-se que foi encontrado o ácido esteárico (C18:0) e o erúico (C22:1n9) que são ácidos graxos majoritários no lisado celular de macrófagos murinos controle. Já no lisado celular de macrófagos infectados foram encontrados em sua maioria ácidos graxos como o esteárico (18:0), o ácido araquidônico (C20:4n6), o ácido palmítico (C16:0), e, o ácido 4,7,10,13,16,19-docosaheptaenóico (22:1n9). No sobrenadante

das células infectadas além destes foram encontrados o ácido oleico (C18:1n9c) e o ácido linoleico (C18:2n6), dentre outros ácidos graxos insaturados, o que sugere que há um perfil de secretar ácidos graxos com este caráter.

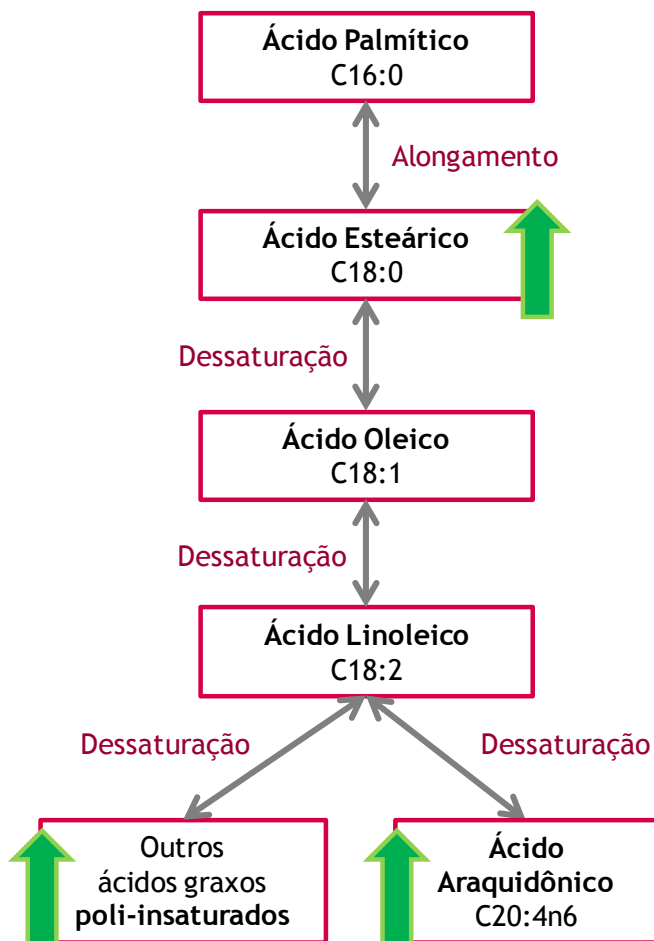


Figura 13. Esquema de alongamento e dessaturação de ácidos graxos de cadeia longa.

O aumento desse perfil de ácidos graxos pelos macrófagos infectados indica relação com a formação dos eicosanoides, já que seus substratos são o ácido dihomo-gama-linolênico, o ácido araquidônico e o ácido eicosapentaenóico. Para a síntese destas substâncias, o ácido graxo precursor é clivado dos fosfolipídios de membrana pela ação da fosfolipase A2 ou fosfolipase C, dependendo do subtipo fosfatidil ao qual o ácido graxo essencial está ligado.

Ácidos graxos *trans* como o erúico (C22:1n9), o ácido araquidônico (C20:4n6), ácido 4,7,10,13,16,19-docosahexaenóico (22:1n9), ácidos oleico (C18:1n9c) e linoleico (C18:2n6), estão ligados ao aumento do colesterol total e redução de lipoproteínas de alta densidade (HDL), sendo fator prejudicial e agravante de doenças cardiovasculares (LI, 2018;

BORTOLOTTI, 2005). Ácidos graxos *trans* podem induzir também a resistência a insulina de forma aguda (BRAY, 2002).

Ácidos graxos como: láurico (C12:0), palmítico (C16:0), linoleico (C18:2n6c), oleico (C18:1n9c) e esteárico (C18:0) são conhecidos por propriedades antibacterianas e antifúngicas. De modo intrigante, ácidos graxos insaturados são mais eficazes no controle microbiano (ZHENG, 2005). Apesar de ser dito na literatura que uma maior incidência de insaturação destes ácidos graxos elucida a comprovação de uma possível eficácia terapêutica, esses ácidos graxos se mostram elevados nos macrófagos infectados, o que leva a indagar que esteja ocorrendo uma resposta imune mediada pelos macrófagos que module o metabolismo de lipídios em prol de dessaturar lipídios e/ou manter alguns deles numa forma que limite a infecção parasitária.

Parasitas como *Leishmania (L.) amazonensis* induzem a presença de lipases tais como a fosfolipase A2, que promove a quebra da fosfatidilcolina em lisofosfatidilcolina e ácido araquidônico, que é precursor da prostaglandina E2 (HENRIQUES, 2003). O aumento dos níveis de ácido araquidônico no sobrenadante de macrófagos infectados indiretamente pode ser justificado devido a equilíbrio na produção de prostaglandina E2.

O esquema na figura 14 representa e de maneira sucinta o mecanismo captação de ácido palmítico-<sup>3</sup>H, seu estoque (que pode ocorrer preferencialmente em gotículas lipídicas), seguido da síntese de triacilglicerol, colesterol esterificado, dentre outros lipídios, distribuição de ácidos graxos e secreção para o sobrenadante, em macrófagos murinos infectados por *Leishmania (L.) amazonensis*. Além disso, no mesmo esquema, com ênfase na representação dos esqueletos de carbono, é visto que dentro das reservas energéticas dos macrófagos infectados há abundância de ácido esteárico, palmítico e araquidônico, enquanto no sobrenadante vê-se, além desses, ácidos graxos como o ácido oleico e linoleico, produtos da dessaturação do ácido esteárico.

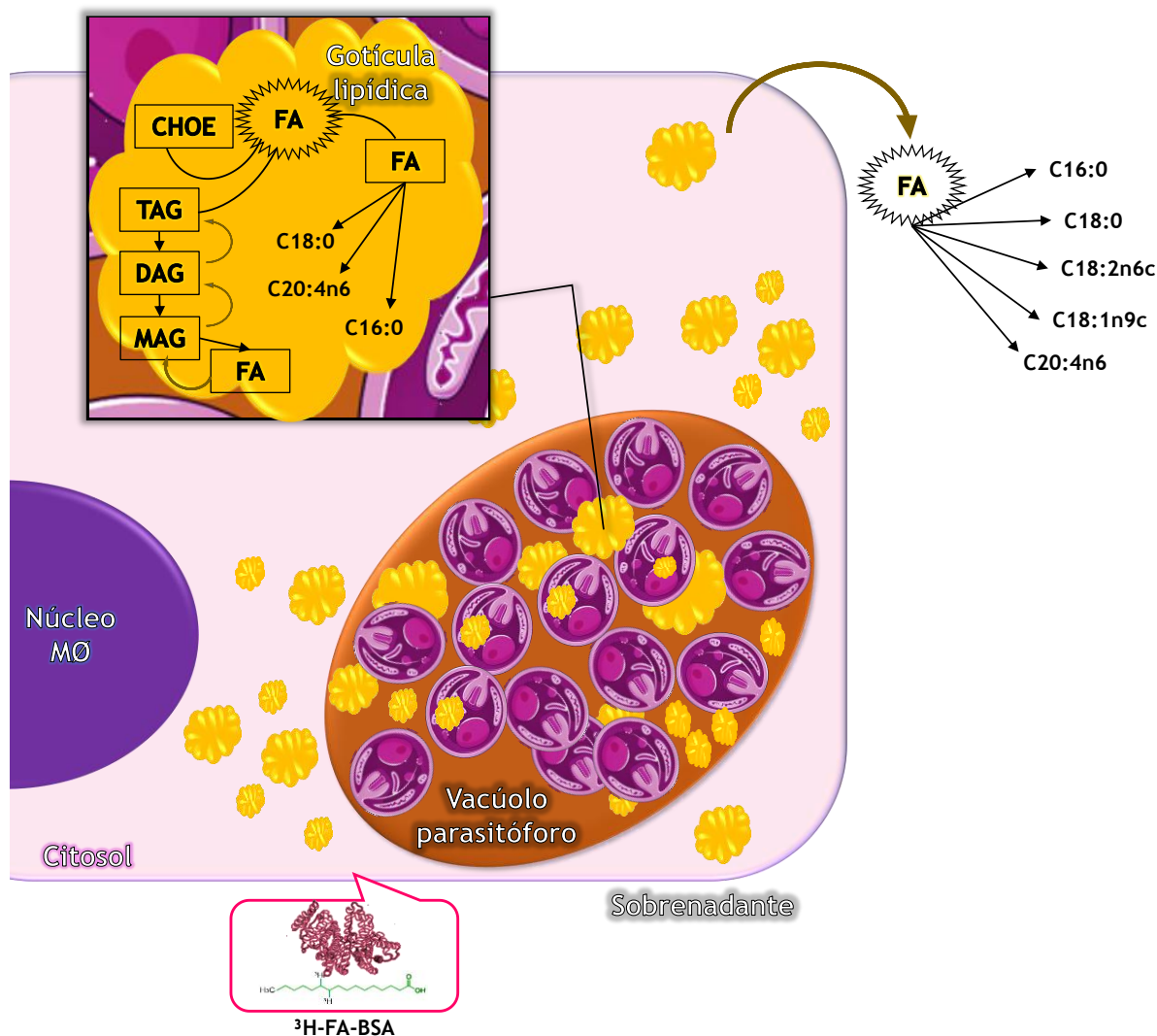


Figura 14. Representação esquemática do mecanismo captação de ácido palmítico- $^3\text{H}$ , seu estoque, seguido da síntese de outros lipídios, distribuição de ácidos graxos e secreção para o sobrenadante, em macrófagos murinos infectados por *Leishmania (L.) amazonensis*. Em ênfase: MØ – macrófagos peritoneais de obtidos de camundongos BALB/c;  $^3\text{H}$ -FA-BSA – precursor lipídico ácido palmítico- $^3\text{H}$  complexado a albumina sérica bovina livre de ácidos graxos; FA – ácidos graxos; CHOE – colesterol esterificado; TAG – triacilglicerol; DAG – diacilglicerol; MAG – monoacilglicerol; C16:0 – Ácido palmítico; C18:0 – Ácido esteárico; C18:1n9c – Ácido oleico; C18:2n6 – Ácido linoleico; C20:4n6 – Ácido araquidônico.



## 7. CONCLUSÃO

- ♦ As análises indicaram uma maior absorção de ácido palmítico-<sup>3</sup>H em macrófagos murinos parasitados por *Leishmania (L.) amazonensis* em comparação aos controles;
- ♦ Especialmente em classes de lipídios neutros tais como ácidos graxos, triacilglicerol e colesterol esterificado, é observada maior biossíntese pelos macrófagos murinos parasitados por *Leishmania (L.) amazonensis*.
- ♦ Ácidos graxos como o ácido palmítico (C16:0), o ácido esteárico (18:0), o ácido araquidônico (C20:4n6) estão entre os principais constituintes nos macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c parasitados por *Leishmania (L.) amazonensis*.
- ♦ Os resultados mostram que há clara alteração do metabolismo de lipídios em macrófagos infectados. Tal alteração está relacionada com a manipulação dessas macromoléculas por *Leishmania (L.) amazonensis*, uma vez que necessita de lipídios para sua sobrevivência e principalmente de sua proliferação no hospedeiro.

## 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALVES ÉAR, DE MIRANDA MG, BORGES TK, MAGALHÃES KG, MUNIZ-JUNQUEIRA MI. Anti-HIV drugs, lopinavir/ritonavir and atazanavir, modulate innate immune response triggered by *Leishmania* in macrophages: the role of NF- $\kappa$ B and PPAR- $\gamma$ . *Int Immunopharmacol.* 2015 Feb;24(2):314-324. doi: 10.1016/j.intimp.2014.12.025. Epub 2014 Dec 26.
- ARAÚJO-SANTOS T, RODRIGUEZ NE, MOURA-PONTES S, et al. Role of prostaglandin F2alpha production in lipid bodies from *Leishmania infantum* chagasi: insights on virulence. *J Infect Dis.* 2014;210:1951-1961. Epub 2014 May 19.
- BAYNES, J. *Bioquímica médica*. [tradução de Jacyara Maria Brito Macedo... et al. *Medical biochemistry*, 3rd ed.]. - Rio de Janeiro: Elsevier, 2010.
- BERMAN, J. D.; HOLZ, G. G. Jr & BEACH, D. H. Effects of ketoconazole on growth and sterol biosynthesis of *Leishmania mexicana* promastigotes in culture. *Mol. Biochem. Parasitol.*, 12(1): 1-13. 1984.
- BLIGH, E.G. & DYER, W.J. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can. J. Biochem. Physiol.*, 37(8): 911-913. 1959.
- BORTOLOTO JW, REIS C, FERREIRA A, COSTA S, MOTTIN CC, SOUTO AA, GUARAGNA RM. Higher content of trans fatty acids in abdominal visceral fat of morbidly obese individuals undergoing bariatric surgery compared to non-obese subjects. *Obes Surg.* 2005 Oct;15(9):1265-70. PubMed PMID: 16259884.
- BRAY GA, LOVEJOY JC, SMITH SR, DELANY JP, LEFEVRE M, HWANG D, RYAN DH, YORK DA. The influence of different fats and fatty acids on obesity, insulin resistance and inflammation. *J Nutr.* 2002 Sep;132(9):2488-91. Review. PubMed PMID: 12221198.
- CHAGAS-LIMA, A. C. Efeito de Lipídios Bioativos: Lisofosfatidilcolina (LPC) e Ácido Lisofosfatídico (LPA) na proliferação, diferenciação celular do *Trypanosoma cruzi* e na sua ligação ao intestino do vetor. Rio de Janeiro, 2016. Dissertação (Mestrado em Química Biológica) Instituto de Bioquímica Médica Leopoldo de Meis, Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ), Rio de Janeiro, 2016.
- CONRAD SM, STRAUSS-AYALI D, FIELD AE, MACK M, MOSSER DM. *Leishmania*-derived murine monocyte chemoattractant protein 1 enhances the recruitment of a restrictive population of CC chemokine receptor 2-positive macrophages. *Infect Immun.* 2007 Feb;75(2):653-65. Epub 2006 Nov 6.
- COPPENS, I., LEVADE, T., COURTOY, P.J., 1995. Host plasma low density lipoprotein particles as an essential source of lipids for the bloodstream forms of *Trypanosoma brucei*. *Journal of Biological Chemistry* 270, 5736–5741.

- CUNHA-E-SILVA NL, ATELLA GC, PORTO-CARREIRO IA, MORGADO-DIAZ JA, PEREIRA MG, et al. (2002) Isolation and characterization of a reservosome fraction from *Trypanosoma cruzi*. *FEMS Microbiol Lett* 214: 7–12.
- DE CICCIO NN, PEREIRA MG, CORRÊA JR, ANDRADE-NETO VV, SARAIVA FB, CHAGAS-LIMA AC, GONDIM KC, TORRES-SANTOS EC, FOLLY E, SARAIVA EM, CUNHA-E-SILVA NL, SOARES MJ, ATELLA GC. LDL uptake by *Leishmania amazonensis*: involvement of membrane lipid microdomains. *Exp Parasitol*. 2012 Apr;130(4):330-40. doi: 10.1016/j.exppara.2012.02.014. Epub 2012 Feb 21.
- DE CICCIO, N. N. T. O papel do colesterol exógeno na biologia do tripanossomatídeo *Leishmania (L.) amazonensis*. Rio de Janeiro, 2014. Tese (Doutorado em Química Biológica), Instituto de Bioquímica Médica Leopoldo de Meis, Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ), Rio de Janeiro, 2014.
- DE MORAIS, CGV; et al. (2014) The Dialogue of the Host-Parasite Relationship: *Leishmania spp.* and *Trypanosoma cruzi* Infection. *BioMed Research International*, vol. 2015, Article ID 324915, 19 pages, 2015.
- DE SOUZA CSF, CALABRESE KS, ABREU-SILVA AL, CARVALHO LOP, CARDOSO FO, DORVAL MEMC, OSHIRO ET, QUARESMA PF, GONTIJO CMF, PACHECO RS, ROSSI MID, DA COSTA SCG, ZAVERUCHA DO VALLE T. *Leishmania amazonensis* isolated from human visceral leishmaniasis: histopathological analysis and parasitological burden in diferente inbred mice. *Histol Histopathol*. 2018 Jul;33(7):705-716. doi: 10.14670/HH-11-965. Epub 2018 Jan 18.
- FONSECA, S. G., ROMÃO, P. R. T., FIGUEIREDO, F., MORAIS, R. H., LIMA, H. C., FERREIRA, S. H., & CUNHA, F. Q. (2003). TNF- $\alpha$  mediates the induction of nitric oxide synthase in macrophages but not in neutrophils in experimental cutaneous leishmaniasis. *European Journal of Immunology*, 33(8), 2297–2306. doi:10.1002/eji.200320335
- FURLONG, S. T. Sterols of parasitic protozoa and helminthes. *Exp. Parasitol.*, 68(4): 482-485. 1989.
- GOMES RS, DE CARVALHO LC, DE SOUZA VASCONCELLOS R, FIETTO JL, AFONSO LC. E-NTPDase (ecto-nucleoside triphosphate diphosphohydrolase) of *Leishmania amazonensis* inhibits macrophage activation. *Microbes Infect*. 2015 Apr;17(4):295-303. doi: 10.1016/j.micinf.2014.12.009. Epub 2014 Dec 30.
- HÅVERSEN L, DANIELSSON KN, FOGELSTRAND L, WIKLUND O. Induction of proinflammatory cytokines by long-chain saturated fatty acids in human macrophages. *Atherosclerosis*. 2009 Feb;202(2):382-93. doi: 10.1016/j.atherosclerosis.2008.05.033. Epub 2008 May 28. PubMed PMID: 18599066.
- HENRIQUES, C; ATELLA, GC; BONILHA, VL; de SOUZA W. Biochemical analysis of proteins and lipids found in parasitophorous vacuoles containing *Leishmania amazonensis*. *Parasitology Research*. v.89, n.2, p.123-33. Jan. 2003.

- IVENS AC, (*et al.*) MYLER PJ. The genome of the kinetoplastid parasite, *Leishmania major*. *Science*. 2005 Jul 15;309(5733):436-42.
- JIN, Y; MCFIE, PJ; BANMAN, SL; BRANDT, C; STONE, SJ. Diacylglycerol Acyltransferase-2 (DGAT2) and Monoacylglycerol Acyltransferase-2 (MGAT2) Interact to Promote Triacylglycerol Synthesis. *The Journal of Biological Chemistry*. v.289, n.41, p.28237-28248. 10 Out 2014. doi: 10.1074/jbc.M114.571190.
- KAYE, P., SCOTT, P. (2011). Leishmaniasis: complexity at the host-pathogen interface. *Nature Reviews Microbiology*, 9: 604-615.
- KLUCK, G. E. G. Infecção por *Plasmodium chabaudi* altera o metabolismo de lipídios em camundongos suíços: Envolvimento da enzima AMPK no mecanismo de regulação. Tese (Doutorado em Química Biológica), Instituto de Bioquímica Médica Leopoldo de Meis, Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ), Rio de Janeiro, 2017.
- KLUCK, G. E. G.; REGIS, K. C. ; CICCIO, N. N. T. ; SILVA-CARDOSO, L. ; PEREIRA, M. G. ; FAMPA, P. ; LIMA, A. C. C. ; ROMEIRO, A. ; CUNHA-SILVA, N. L. ; SILVA -NETO, M. A. ; Atella, G.C. . An evaluation of lipid metabolism in the insect trypanosomatid *Herpetomonas muscarum* uncovers a pathway for the uptake of extracellular insect lipoproteins. *PARASITOLOGY INTERNATIONAL*, p. 97-106, 2017.
- LI K, SINCLAIR AJ, ZHAO F, LI D. Uncommon Fatty Acids and Cardiometabolic Health. *Nutrients*. 2018 Oct 20;10(10). pii: E1559. doi: 10.3390/nu10101559. Review. PubMed PMID: 30347833; PubMed Central PMCID: PMC6213525.
- LECOEUR H, GIRAUD E, PRÉVOST MC, MILON G, LANG T. Reprogramming neutral lipid metabolism in mouse dendritic leucocytes hosting live *Leishmania amazonensis* amastigotes. *PLoS Negl Trop Dis*. 2013 Jun 13;7(6):e2276. doi: 10.1371/journal.pntd.0002276. Print 2013.
- LOPES, TIB. Avaliação do perfil de ácidos graxos em pacientes com sobrepeso tratados com orlistate usando GC-EM e avaliação do perfil metabólico do plasma por RMN de <sup>1</sup>H. [Dissertação] – Campinas, SP: [sn], 2012.
- MARTINS VT, LAGE DP, DUARTE MC, CARVALHO AM, COSTA LE, MENDES TA, VALE DL, MENEZES-SOUZA D, ROATT BM, TAVARES CA, SOTO M, COELHO EA. A recombinant fusion protein displaying murine and human MHC class I- and II-specific epitopes protects against *Leishmania amazonensis* infection. *Cell Immunol*. 2017 Mar;313:32-42. doi: 10.1016/j.cellimm.2016.12.008. Epub 2016 Dec 28.
- MORITA, Y.S.; PAUL, K.S. & ENGLUND, P.T. Specialized fatty acid synthesis in African trypanosomes: myristate for GPI anchors. *Science*. 288(5463): 140-143. 2000.
- MOTA LA, ROBERTO NETO J, MONTEIRO VG, LOBATO CS, OLIVEIRA MA, CUNHA MD, D'ÁVILA H, SEABRA SH, BOZZA PT, DAMATTA RA. Culture of mouse peritoneal macrophages with mouse serum induces lipid bodies that associate

with the parasitophorous vacuole and decrease their microbicidal capacity against *Toxoplasma gondii*. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2014 Sep;109(6):767-74. Epub 2014 Aug 13.

NELSON, D. & COX, MM. Princípios de bioquímica de Lehninger [recurso eletrônico] [tradução: Ana Beatriz Gorini da Veiga ... et al.] ; revisão técnica: Carlos Termignoni... [et al.]. – 6. ed. – Dados eletrônicos. – Porto Alegre : Artmed, 2014.

PAIXÃO, RITA LEAL. As Comissões de Ética no Uso de Animais. Disponível em <http://www.furb.br/web/1915/inovacao-e-pesquisa/comites-de-etica>. Acesso em 17 09 2017.

RABHI, S., RABHI, I., TRENTIN, B., PIQUEMAL, D., REGNAULT, B., GOYARD, S., ... GUIZANI-TABBANE, L. Lipid droplet formation, their localization and dynamics during *Leishmania major* macrophage infection. PLoS One. v.11, n.2, e0148640, 12 Fev. 2016. Disponível em: 10.1371/journal.pone.0148640.

RODRÍGUEZ NE, LOCKARD RD, TURCOTTE EA, ARAÚJO-SANTOS T, BOZZA PT, BORGES VM, WILSON ME. Lipid bodies accumulation in *Leishmania infantum*-infected C57BL/6 macrophages. Parasite Immunol. 2017 Aug;39(8). doi: 10.1111/pim.12443. Epub 2017 Jun 16.

ROGERS ME. The role of leishmania proteophosphoglycans in sand fly transmission and infection of the Mammalian host. Front Microbiol. 2012 Jun 28;3:223. doi: 10.3389/fmicb.2012.00223. eCollection 2012.

ROGERS, M., KROPF, P., CHOI, B. S., DILLON, R., PODINOVSKAIA, M., BATES, P., AND MÜLLER, I. (2009). Proteophosphoglycans regurgitated by *Leishmania*-infected sand flies target the L-arginine metabolism of host macrophages to promote parasite survival. PLoS Pathog. 5, e1000555. doi:10.1371/journal.ppat.1000555

ROGERS, M. E., CHANCE, M. L, AND BATES, P. A. (2002). The role of promastigote secretory gel in the origin and transmission of the infective stage of *Leishmania mexicana* by the sand fly *Lutzomyia longipalpis*. Parasitology 124,495–507.

SCHLEIN, Y., Jacobson, R. L., and Messer, G. (1992). *Leishmania* infections damage the feeding mechanism of the sand fly vector and implement parasite transmission by bite. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 89, 9944–9948.

SCOTT P, SCHARTON T. Interaction between the innate and the acquired immune system following infection of different mouse strains with *Leishmania major*. Ann N Y Acad Sci. 1994 Aug 15;730:84-92.

SHAW, J.J. (2006). Further thoughts on the use of the name *Leishmania* (*Leishmania*) *infantum* *chagasi* for the aetiological agent of American visceral leishmaniasis. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz 101: 577-579.

- SPATH, G. F. et al. The role(s) of lipophosphoglycan (LPG) in the establishment of *Leishmania major* infections in mammalian hosts. *Proc Natl Acad Sci U S A*, v. 100, n. 16, p. 9536-41, Aug 05 2003. ISSN 0027-8424 (Print)
- STEVERDING, D. The history of leishmaniasis. *Parasites & Vectors*. (2017) v.10. n.82. 15 Fev. 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/s13071-017-2028-5>. Acesso em: 03 set 2018, 20:52minh.
- TEIXEIRA, DE. [et al.]. Atlas didático: Ciclo de vida da *Leishmania*. Rio de Janeiro: Fundação CECIERJ, Consórcio CEDERJ, 2013. 64p.
- VANCE, D. E. A. VANCE., J.E. *Biochemistry of Lipids, Lipoproteins and Membranes*. 5th. New York: Elsevier Science, 2008.
- VERAS PST, RAMOS PIP, DE MENEZES JPB. In Search of Biomarkers for Pathogenesis and Control of Leishmaniasis by Global Analyses of *Leishmania*-Infected Macrophages. *Front Cell Infect Microbiol*. 2018 Sep 19;8:326. doi: 10.3389/fcimb.2018.00326. eCollection 2018. Review.
- VERMA P, KUREEL AK, SAINI S, PRAKASH S, KUMARI S, KOTTARATH SK, SRIVASTAVA SK, BHAT M, DINDA AK, THAKUR CP, SHARMA S, RAI AK. *Leishmania donovani* reduces the levels of retinoic acid-synthesizing enzymes in infected macrophages and favoring its own survival. *Parasitol Res*. 2018 Oct 18. doi: 10.1007/s00436-018-6115-0.
- VOGEL, W.G.; ZIEVE, L. & CARLETON, R.O. Measurement of serum lecithin, lysolecithin, and sphingomyelin by a simplified chromatographic technique. *J. Lab. Clin. Med.*, 59: 335-344. 1962.
- World Health Organization: WHO| Leishmaniasis. Fact sheet. Updated April 2017. Disponível em: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs375/en/>. Acesso em: 24 set. 18, 13h50minh.
- ZHENG, C.J.; YOO, J. S.; LEE, T. G.; CHO, H. Y.; KIM, Y. H.; KIM, W. G. Fatty acid synthesis is a target for antibacterial activity of unsaturated fatty acids. *FEBS Letters* 579: 5157-5162, 2005.